

---

# **BACHELOR- ARBEIT**

---

Herr  
**Dennis Kunze**

**Produktion von rekombinanten  
Proteinen zur Verwendung in  
Reagenzien für die in-vitro  
Diagnostik**

Mittweida, 2015

---

# **BACHELOR- THESIS**

---

Herr  
**Dennis Kunze**

**Production of recombinant  
proteins for use in reagents for  
the in vitro diagnostics**

Mittweida, 2015

---

# **BACHELORARBEIT**

---

## **Produktion von rekombinanten Proteinen zur Verwendung in Reagenzien für die in-vitro Diagnostik**

Autor:  
**Herr**

**Dennis Kunze**

Studiengang:  
**Biotechnik/Bioinformatik**

Seminargruppe:  
**BI12w2-B**

Erstprüfer:  
**Prof. Dr. Röbbbe Wünschiers**

Zweitprüfer:  
**Dr. Erik Böer**

weitere Betreuer:  
**M. Sc. Dipl. Ing. René Kretschmer**

Einreichung:  
**Mittweida, 01.09.2015**

Verteidigung/Bewertung:  
**Mittweida, 2015**

## **Abstract**

Hefen sind widerstandsfähig, haben eine vergleichsweise hohe Reproduktionsrate und bieten eine Vielzahl posttranslationaler Modifikationen und Sekretionswege. Aus diesem Grund wurde die Hefe *P. pastoris* als Expressionswirt ausgesucht, um das Enzym Cholesterinesterase rekombinant herzustellen. Dafür soll ein Klon mit hoher Enzymausbeute erzeugt werden. Zusätzlich musste das optimale Kultivierungsmedium gefunden, die Langzeitstabilität ermittelt und gleichzeitig die Funktionalität in einem Reagenz nachgewiesen werden, in dem es später als eine Komponente eingesetzt werden soll. Es wurden die drei Stämme von *P. pastoris* X33, SMD1168H und KM71H eingesetzt, um jeweils die Plasmide pGAPZαA-COE1 und pGAPZαA-COE1-6H mithilfe der Elektroporation in die Stämme zu transformieren. In der Zelle wird das Plasmid durch homologe Rekombination in das Hefegenom integriert. Zum Linearisieren der Plasmid-DNA wurden die Restriktionsenzyme *AvrII* und *BspHI* eingesetzt. Daraus ergab sich die Kombination aus Stamm, Restriktionsenzym und Konstrukt, welche den Klon mit der höchsten Ausbeute erzeugt. So wurde der Klon E1 mit einer Enzymaktivität von 8,2 U/mL erzeugt, indem das Konstrukt pGAPZαA-COE1-6H mit dem Restriktionsenzym *AvrII* in den Stamm KM71H transformiert wurde. Die Enzymaktivität wurde mit einer Methode ermittelt, die auf der Reaktion des Enzyms mit p-Nitrophenol-octanoaten basiert. Im weiteren Verlauf wurde das Kultivierungsmedium für den Klon optimiert. Von den drei eingesetzten Medien SYN6, FM22 und YNB stellte sich SYN6 als das Medium mit der höchsten Ausbeute heraus. Eine weiterführende Variierung der CaCl-Konzentration im Kultivierungsmedium ergab eine optimale Konzentration von 1%, bei gleichzeitiger Erhöhung der Langzeitstabilität. Zusätzliche Versuche zur Erhöhung der Langzeitstabilität mit Zusätzen wie RSA, Glycerin oder EDTA ergaben, dass die Langzeitstabilität am besten ohne jegliche Zusätze garantiert werden kann. Weiterführend muss über ein Scale-up Prozess nachgedacht werden und parallel dazu ein downstream-Prozess entwickelt werden, um die steigende Menge an Kulturüberstand verarbeiten zu können.

## **Danksagung**

Ich widme diese Arbeit meiner geliebten Oma. Danke dass du immer an meiner Seite warst. Es nimmt der Augenblick, was Jahre geben. Doch der Mensch ist erst wirklich tot, wenn niemand mehr an ihn denkt.

Mein Dank gilt vor Allem meinen Eltern, die mir das Studium erst ermöglicht haben und mich immer bei allem unterstützt haben. Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. R. Wünschiers und Herrn M. Sc. Dipl. Ing. R. Kretschmer für die Jahre des Studiums, in denen sie mich begleitet- und mir das Wissen vermittelt haben, das diese Arbeit erst ermöglichte. Nicht zuletzt hatte auch Herr Dr. E. Böer einen großen Beitrag an der Arbeit. Es war mir eine Freude an Ihrer Seite arbeiten zu dürfen, auch wenn es manchmal stressig wurde. Ein großer Dank gilt auch der Firma HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH und allen ihren Mitarbeitern, die die Arbeit ermöglicht und mich herzlich aufgenommen haben.

Und um bis zu den Wurzeln zurück zu gehen möchte ich auch Frau Brämer danken, die mich durch den Biounterricht in der Oberstufe gebracht und für das Fach begeistert hat.

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Pichia pastoris</i> .....	2
1.2 Transformationsmethoden .....	3
1.3 Homologe Rekombination .....	5
1.4 Cholesterin .....	6
<b>2 Zielstellung .....</b>	<b>10</b>
<b>3 Material.....</b>	<b>11</b>
3.1 Geräte .....	11
3.2 Chemikalien .....	12
3.3 Molekularbiologische Reagenzien.....	12
3.4 Verbrauchsgegenstände .....	16
<b>4 Methoden .....</b>	<b>17</b>
4.1 Plasmidpräparation .....	17
4.1.1 Transformation von NEB 5 $\alpha$ -Zellen .....	17
4.1.2 DNA Minipräparation.....	17
4.2 Transformation von DNA in Hefe .....	18
4.2.1 DNA Restriktion und Reinigung .....	18
4.2.2 Agarosegelelektrophorese.....	19
4.2.3 Herstellung elektrokompetenter Hefezellen .....	19
4.2.4 Elektroporation .....	20
4.3 Kultivierung der erhaltenen Transformanden.....	21
4.3.1 Kultivierung in einer 48er Deep-well Platte .....	21
4.3.2 Kultivierung im Schüttelkolben.....	21
4.4 Screening der Kulturüberstände.....	22
4.4.1 Messung in 96er-well Platte .....	22
4.4.2 Messung in der Küvette .....	22

4.5 Medientest.....	23
4.6 Langzeitstabilitäts-Test.....	23
4.7 Reagenztest .....	23
<b>5 Ergebnisse.....</b>	<b>25</b>
5.1 Kontrollagarosegel.....	25
5.2 Transformation von <i>Pichia pastoris</i> .....	26
5.2.1 pGAPZ $\alpha$ A-COE1 .....	26
5.2.2 pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H .....	31
5.3 Medientest.....	35
5.4 Langzeitstabilitäts-Test.....	36
5.5 Reagenztest .....	39
<b>6 Diskussion .....</b>	<b>41</b>
<b>7 Ausblick .....</b>	<b>45</b>
<b>8 Zusammenfassung .....</b>	<b>46</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
Dissertationen .....	VI
Quellen aus dem Internet .....	VI
<b>Selbstständigkeitserklärung.....</b>	<b>VII</b>

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 – Kontrollagarosegel.....	25
Abbildung 2 - Messung der ÜS - SMD1168H/pGAPZ $\alpha$ A-COE1, mit <i>AvrII</i> linearisierter Plasmid-DNA transformiert.....	27
Abbildung 3 - Messung der ÜS - SMD1168H/pGAPZ $\alpha$ A-COE1, mit <i>BspHI</i> linearisierter Plasmid-DNA transformiert .....	27
Abbildung 4 - Messung der ÜS - KM71H/pGAPZ $\alpha$ A-COE1, mit <i>AvrII</i> linearisierter Plasmid-DNA transformiert.....	28
Abbildung 5 - - Messung der ÜS - KM71H/pGAPZ $\alpha$ A-COE1, mit <i>BspHI</i> linearisierter Plasmid-DNA transformiert.....	28
Abbildung 6 - Messung der ÜS - X33/pGAPZ $\alpha$ A-COE1, mit <i>AvrII</i> linearisierter Plasmid-DNA transformiert.....	29
Abbildung 7 - Messung der ÜS - X33/pGAPZ $\alpha$ A-COE1, mit <i>BspHII</i> linearisierter Plasmid-DNA transformiert.....	29
Abbildung 8 - Messung der ÜS - SMD1168H/pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H, mit <i>AvrII</i> linearisierter Plasmid-DNA transformiert .....	32
Abbildung 9 - Messung der ÜS - SMD1168H/pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H, mit <i>AvrII</i> linearisierter Plasmid-DNA transformiert .....	32
Abbildung 10 - Messung der ÜS - KM71H/pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H, mit <i>AvrII</i> linearisierter Plasmid-DNA transformiert .....	33
Abbildung 11 - Messung der ÜS - KM71H/pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H, mit <i>AvrII</i> linearisierter Plasmid-DNA transformiert .....	33
Abbildung 12 - Messung der ÜS - X33/pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H, mit <i>AvrII</i> linearisierter Plasmid-DNA transformiert.....	34
Abbildung 13 - Messung der ÜS - X33/pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H, mit <i>AvrII</i> linearisierter Plasmid-DNA transformiert.....	34
Abbildung 14 – Kultivierung des Klonen E1 im SYN6-Medium ohne CaCl <sub>2</sub> . Die Aliquote wurden mit Zusätzen versetzt .....	36
Abbildung 15 - Kultivierung des Klonen E1 im SYN6-Medium mit 0,1% CaCl <sub>2</sub> . Die Aliquote wurden mit Zusätzen versetzt. ....	37
Abbildung 16 - Kultivierung des Klonen E1 im SYN6-Medium mit 1% CaCl <sub>2</sub> . Die Aliquote wurden mit den Zusätzen versetzt .....	38



## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 - Transformanzzahlen der drei Stämme - Plasmid pGAPZ $\alpha$ A-COE1 linearisiert mit <i>AvrII</i> bzw. <i>BspHI</i> .....	26
Tabelle 2 - Transformationseffizienzen der verschiedenen Transformationsansätze – Es wurden 8 $\mu$ g pGAPZ $\alpha$ A Plasmid-DNA eingesetzt.....	26
Tabelle 3 – Ermittlung der Enzymaktivität ausgewählter Klone mit dem Konstrukt pGAPZ $\alpha$ A-COE1 nach Inkubation ÜN in einem 100 mL Schüttelkolben mit 5 mL Selektiv-Medium.....	30
Tabelle 4 - Transformanzzahlen der drei Stämme - Plasmid pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H linearisiert mit <i>AvrII</i> .....	31
Tabelle 5 - Transformationseffizienzen der verschiedenen Transformationsansätze – Es wurden 8 $\mu$ g pGAPZ $\alpha$ A Plasmid-DNA eingesetzt.....	31
Tabelle 6 - Ermittlung der Enzymaktivität ausgewählter Klone mit dem Konstrukt pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H nach Inkubation ÜN in einem 100 mL Schüttelkolben mit 5 mL Selektiv-Medium.....	35
Tabelle 7 – Medientest.....	35
Tabelle 8 - Reagenztest mit den Kontrollseren.....	39
Tabelle 9 – Prozentuale Abweichung der Messergebnisse von den Sollwerten der Kontrollseren. ....	40

**Abkürzungsverzeichnis**

A. dest	entionisiertes Wasser
AvrII	Restriktionsenzym zum Linearisieren der Plasmid-DNA vor der Transformation
bp	Basenpaare
BspHI	Restriktionsenzym zum Linearisieren der Plasmid-DNA vor der Transformation
COE	Cholesterinesterase
DNA	Desoxyribonucleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
kbp	Kilobasenpaare
Klon E1	KM71H/pGAPZαA-COE1-6H
KM71H	Stamm von <i>Pichia pastoris</i>
LB-Agar	lysogeny broth-Agar
NiNTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure = Material zum Reinigen von His getaggtten Proteinen
OD	optische Dichte
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i> , oder auch <i>Komagataella pastoris</i>
pGAPZαA-COE1	Plasmid mit eingebautem Cholesterinesterase-Gen
pGAPZαA-COE1-6H	Plasmid mit eingebautem Cholesterinesterase-Gen und His-Tag
RT	Raumtemperatur
SMD1168H	Stamm von <i>Pichia pastoris</i>
SOB	Super Optimal Broth
SOC	SOB-Medium + 20 mM Glucose
UV-Licht	ultra violettes Licht
ÜN	über Nacht
ÜS	Überstand
X33	Stamm von <i>Pichia pastoris</i>
YPD	YEPD - yeast extract peptone dextrose

## **1 Einleitung**

Das Wort „Gentechnik“ verbreitet, heute wie nie zuvor, Abneigung, Angst und Unverständnis in der Bevölkerung, ähnlich dem „kalten Krieg“ oder der „Atombombe“ in den 70er Jahren. Es ist eher Unwissenheit, welche die Menschen abschreckt, denn nicht jeder veränderte Organismus entpuppt sich als der alles vernichtende Keim, wie die Medien einem weis machen wollen. Vielmehr steckt hier ein enormes Potential, mit dem wesentliche Bereiche der Wirtschaft bis hin zur Gesellschaft verändert und vor allem verbessert werden können. Dieselben Aktivisten, welche die Massentierhaltung verurteilen, kämpfen ebenso vehement gegen die Gentechnik, dabei könnte das eine durch das andere reduziert, wenn nicht gar ersetzt werden. Allein für den pharmazeutischen Sektor werden unzählige Tiere benötigt, aus deren Organen man wichtige Enzyme, Antikörper und diverse andere Proteine für Impfstoffe, Seren bis hin zu medizinischen Tests extrahiert. Der Chemie-Sektor stößt hier an seine Grenzen, denn alles künstlich zu synthetisieren, dazu ist man bei weitem nicht in der Lage. Zusätzlich würden chemische Abfallprodukte der Umwelt potentiell mehr schaden, als dass die Erzeugnisse einem helfen. Dabei sind genetisch identische Proteine aus verschiedenen Organismen bereits so verschieden, dass man dieses Phänomen unmöglich nachstellen kann. Es gibt nur die aussichtsreiche Möglichkeit, das Protein aus anderen Organismen zu extrahieren, um dort eine Alternativquelle zur bisherigen zu erhalten. Und da kommt die Gentechnik ins Spiel. Gemeint sind nicht einfach andere Tiere nehmen, sondern Mikroorganismen, von denen viele Millionen nur wenige Milliliter Flüssigkeit zum überleben brauchen. Ganz so einfach ist es natürlich nicht und es bedarf einiger Forschungsarbeit, aber es gibt bereits zahlreiche erfolgreiche Beispiele dafür. Den meisten Menschen wird wahrscheinlich nicht bewusst sein, dass das Insulin zur Behandlung von Diabetes-Erkrankungen bereits seit den 80er Jahren dank der Gentechnik in Hefen und Bakterien produziert wird. Davor wurden die Bauchspeicheldrüsen von Schweinen genutzt, um an das Enzym heran zu kommen. Vorher war das Insulin nur für die besser verdienende Bevölkerung erschwinglich, denn das Verfahren war nicht sehr effektiv und man konnte die steigende Nachfrage nicht bedienen. So konnte man nur mithilfe der Gentechnik die medizinische Versorgung der breiten Bevölkerung gewährleisten. [URL-1]

## 1.1 *Pichia pastoris*

*Pichia pastoris*, oder auch *Komagataella pastoris*, ist eine Hefeart und nahe verwandt mit der weit verbreiteten Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Die Erscheinungsform ist nahezu identisch, mit runden bis ovalen Zellen, die einen Durchmesser von 5-10 µm aufweisen und sich durch Knospung vermehren. Die Besonderheit von *P. pastoris* stellt ihr Methanol-Metabolismus dar. Im Jahr 1970 wurde erstmals mit dieser Hefeart in großem Maßstab gearbeitet. Damals verkannte man noch den biotechnologischen Nutzen und verwendete sie stattdessen als Tierfutter, da das billige Methanol als Kohlenstoffquelle genutzt werden konnte. Erst ein Jahrzehnt später, als die Ölpreise stiegen und das Methanol als Ausgangsstoff für Tierfutter unrentabel wurde, beschäftigte man sich mit der Genexpression in *P. pastoris*. Seit 1993 gibt es eine Methodik und ein Patent, um mittels *P. pastoris* Proteine herzustellen [Cereghino & Cregg, 2000].

*P. pastoris* hat sich zu einem der wichtigsten Expressionssysteme und bedeutenden Modellorganismus in der Biotechnologie entwickelt. Die genetische Veränderung dieser Hefeart gestaltet sich vergleichsweise einfach. Darüber hinaus besteht eine hohe genetische Identität zu *Saccharomyces cerevisiae*, welche schon seit grauer Vorzeit im Mittelpunkt der menschlichen Aufmerksamkeit stand und eines der am besten erforschten Mikroorganismen ist. Dadurch war schon vieles über *P. pastoris* bekannt, bevor man überhaupt anfang damit zu arbeiten. Es hat sich auch herausgestellt, dass sie in der Lage ist, große Mengen rekombinanter Proteine sowohl intra-, als auch extrazellulär zu exprimieren [Cereghino & Cregg, 2000]. Diese Fähigkeit verringert aufwändige und vor allem teure Protein-Extraktionsverfahren, da die produzierten Proteine direkt in das Medium abgegeben werden. Als Eukaryot ist *P. pastoris* in der Lage durch, posttranslationale Modifikationen, die Langzeitstabilität von Proteinen deutlich zu erhöhen. Eine dieser Modifikationen ist die Glycosylierung. Bei diesem Vorgang werden verschiedene Zuckerreste an Proteine gebunden, was die Stabilität dieser Proteine signifikant erhöht. Es hat sich heraus gestellt, dass *P. pastoris* ebenso eine Quelle bisher unbekannter Proteine war. Durch seinen substratinduzierten Methanol-Metabolismus entdeckte man nicht nur einzigartige Enzyme, sondern erlangte ebenso Erkenntnisse über substratinduzierte Genexpression.

Je nach Anwendungsabsicht, existieren von *P. pastoris* verschiedene Stämme mit speziellen Eigenschaften. X33 ist ein Wildtyp-Stamm von *P. pastoris*. Er zeichnet sich vor allem durch seine Robustheit aus, sodass er Transformations- und Selektionsmethoden, welche die Zellen stark beanspruchen, potentiell besser verträgt. Zusätzlich ist dieser Stamm prototroph. Er ist also in der Lage, alle benötigten organischen Wachstumsfaktoren selbst zu synthetisieren [Ahmad et. al., 2014]. Der Stamm SMD1168H ist Protease defizient. Das heißt spezielle Gene wurden deletiert, um eine Expression von Proteasen zu verhindern, wie etwa die Carboxypeptidase Y oder die Proteinase B. Normalerweise bewirkt dies, dass Proteine bereits außerhalb der Zelle gespalten werden, um so die Aufnahme von Nährstoffen für die Hefezelle zu vereinfachen. Dies führt jedoch zu Problemen, wenn zusätzlich ein rekombinantes Gen eines Proteins exprimiert wird. Vor allem bei der Expression von Protease-sensitiven Proteinen konnten mit diesem Stamm positive Ergebnisse erzielt werden [Ahmad et. al., 2014]. Dann kann es dazu kommen, dass die Zelle das synthetisierte Protein direkt wieder abbaut, was zu einer reduzierten Ausbeute führt. Ein weiterer Stamm ist KM71H. Dieser besitzt im Vergleich zu anderen Stämmen eine höhere Toleranz gegenüber Methanol. Dafür besitzt dieser Stamm ein spezielles Gen, welches für die Aldehyd Oxidase 1 codiert. Dieses Enzym besitzt eine breite Substratspezifität. Unter anderem kann es Aldehyde spalten, welche die Zelle dann als Nährstoffquelle nutzen kann [URL-2].

## **1.2 Transformationsmethoden**

Es gibt im Wesentlichen zwei Methoden, die für die Transformation von Hefezellen eingesetzt werden. Zum einen die chemische Transformation, oder auch Heat-shock Methode, zum anderen die elektrische Methode, oder auch Elektroporation. Jede der Methoden hat ihre Vor- und Nachteile. Bevor eine der Methoden durchgeführt werden kann, müssen die Zellen jeweils speziell behandelt, kompetent für die Aufnahme von DNA gemacht werden. Dabei ist die Präparation von chemisch kompetenten und elektrokompenten Zellen eine zeitaufwändige Arbeit. So sind zum Beispiel für die Herstellung von elektrokompenten Zellen zahlreiche Waschschrirte und Inkubationen erforderlich, damit am Ende möglichst keine Salze mehr in der Zellsuspension

vorhanden sind, die Leitfähigkeit also möglichst gering ist. Denn bei der Transformation selbst werden die Zellen für wenige Millisekunden mit bis zu 2000 V behandelt. Würden sich zu diesem Zeitpunkt noch Salze in der Suspension befinden, würde dies einen Kurzschluss verursachen. Der dabei entstehende Lichtbogen ist heiß genug, um alle Zellen abzutöten. Im Gegensatz zur Vorbehandlung der Zellen, die mehrere Stunden dauert, ist die Transformation selbst in wenigen Minuten abgeschlossen. Bei der chemischen Methode verhält es sich umgekehrt. Hier geht die Vorbereitung der Zellen schneller vonstatten, wohingegen die Transformation selbst deutlich mehr Zeit in Anspruch nimmt. Je nach angewandeter Methode können dabei signifikante Unterschiede in Qualität und Quantität der Transformanden auftreten.

Diese Arbeit baut dabei auf Versuchen auf, bei denen *P. pastoris* mithilfe der Heat-shock Methode transformiert wurde. Es stellte sich heraus, dass diese Methode nur eine sehr geringe Anzahl an Transformanden mit geringer Expression hervorgebracht hat. Aus diesem Grund wurde im Folgenden die Elektroporation als Transformationsmethode ausgewählt, da so eine verbesserte Transformandenausbeute erreicht werden soll. Bestätigt wird dies durch Publikationen, welche sich mit dem Vergleich der beiden Transformationsmethoden bei *P. pastoris* beschäftigen [Cereghino, 2005]. Dabei stellte sich heraus, dass die Transformationseffizienz der Elektroporation bis zu 2000fach höher ist, als die der Heat-shock Methode. Da die DNA-Sequenz des transformierten Vektors mittels homologer Rekombination in das Genom von *P. pastoris* integriert werden soll, ist eine signifikant erhöhte Anzahl an Transformanden für ein Screening von entscheidender Bedeutung.

### 1.3 Homologe Rekombination

Zwei häufig verwendete Methoden Fremd-DNA in einen Organismus zu integrieren sind eine zirkuläre Transformation, oder die homologe Rekombination. Bei der zirkulären Transformation wird ein zirkuläres Plasmid in die Zelle transformiert. Der Nachteil dieser Methode ist, dass man einen permanenten Selektionsdruck aufrecht erhalten muss, da dieses Plasmid von der Zelle leicht wieder abgegeben werden kann, wenn es nicht gebraucht wird. Das heißt man muss zum Beispiel eine Antibiotika-Resistenz auf dem Plasmid verschlüsseln und die Zelle anschließend permanent diesem Antibiotikum aussetzen, damit das Plasmid in der Zelle bleibt und so auch das rekombinante Protein weiter exprimiert wird. Eine Alternative wäre auch ein Auxotrophiemarker. Dabei wird im Genom des Zielorganismus das Synthetisieren einer überlebenswichtigen Substanz, zum Beispiel Adenin, deletiert. Das deletierte Gen wird dann in das zu transformierende Plasmid eingefügt. Somit ist der Zielorganismus dazu gezwungen, das Plasmid zu behalten, um Adenin Synthetisieren zu können. Eine bessere Alternative ist die homologe Rekombination. Hierbei wird nach der Transformation die zuvor linearisierte DNA durch homologe Rekombination fest in das Genom der Zelle integriert. Dabei besitzen das Plasmid und das Genom eine homologe Region. Die homologe DNA Sequenz im Plasmid, meist ein Promotorelement im Plasmid wird durch eine spezifische unikale Restriktase linearisiert. Die beiden homologen Abschnitte verknüpfen sich dann mit den entsprechenden Gegenstücken im Genom des Expressionswirtes. Auf diese Weise wird die Fremd-DNA fest in das Genom der Hefe integriert. Dadurch müssen die Zellen nur direkt nach der Transformation selektiert werden. Eine etwaige spätere Fermentation kann dann ohne jeglichen Selektionsdruck durchgeführt werden, da die Möglichkeit, dass die Transformanden das integrierte Plasmid wieder abgeben, nur sehr gering ist. Dabei kommt es vor, dass der Vektor viele Male in das Genom integriert wird. Je nach Position und Häufigkeit der rekombinanten DNA kann es zu gravierenden Unterschieden in der Expression des rekombinanten Proteins kommen. Deshalb ist es von großer Bedeutung möglichst viele Klone zu screenen, um so den optimalen Klon zu finden.

## 1.4 Cholesterin

Eine Volkskrankheit ist per Definition eine nichtepidemische Krankheit, die aufgrund ihrer Verbreitung und ihrer wirtschaftlichen Auswirkungen sozial ins Gewicht fallen. Darunter fallen Erkrankungen wie Arthrose, Diabetes und Krebs, aber auch Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wie die koronare Herzkrankheit (KHK) oder Schlaganfälle. Dabei spielt der Cholesterinspiegel im Blut eine entscheidende Rolle, meist bedingt durch eine falsche Ernährung oder familiärer Hypercholesterinämie, eine erblich bedingte Störung des Cholesterinstoffwechsels [Siegenthaler, 2005]. Wichtig für den Cholesterinspiegel im Blut sind vor allem der LDL- und der HDL-Cholesterinspiegel. Um das lipophile Cholesterin über das Blut im Körper transportieren zu können, wird es in veresterter Form an Lipoproteine gebunden. Dabei wird in Low- und High Density Lipoproteine unterschieden.

Mithilfe von HDL wird Cholesterin zur Leber transportiert. Deshalb wird es auch als das „gute“ Cholesterin bezeichnet, weil es das Cholesterin aus dem Gewebe heraus und zum Abbau in die Leber transportiert. Den Antagonisten bilden die LDL. Diese transportieren das Cholesterin von der Leber weg, hin zu den Zellen, um dort zur Synthese von Steroiden oder Bildung von Membranen eingesetzt zu werden. Es wird auch als „schlechtes“ Cholesterin bezeichnet, da es zahlreichen Theorien zufolge für die Entstehung von Arteriosklerose und den Folgeerkrankungen wie KHK oder Schlaganfälle verantwortlich ist. Dabei soll vor Allem eine oxidative Modifizierung der LDL für die Bildung arteriosklerotischer Plaques verantwortlich sein. Wie genau diese Prozesse ablaufen und ob die LDL tatsächlich die Ursache dafür sind ist jedoch umstritten. Zahlreiche Studien zeigten jedoch einen Zusammenhang zwischen dem Cholesterinspiegel, vor Allem im Hinblick auf den LDL-Cholesterinspiegel, und auftretenden Folgeerkrankungen wie Arteriosklerose, Gallensteine, Herzinfarkte, Schlaganfälle und Krebs bis hin zu erhöhter Mortalität der Testpersonen [Lopez et al., 2008; Ray & Husain, 2001].

Aus diesem Grund wurde von der NCEP eine Empfehlung verfasst, nach der Patienten zunächst in 3 Risikogruppen eingeteilt werden, je nachdem ob Sie bereits schon einmal eine KHK entwickelt haben (Risikogruppe 1) oder mehr als zwei Risikofaktoren aufweisen (Risikogruppe 2). Darunter zählen etwa Rauchen, erhöhter Blutdruck,



niedriges HDL-Cholesterin oder das Alter (Männer über 45, Frauen über 55). In die Risikogruppe 3 fallen jene Patienten, welche weniger als zwei diese Faktoren aufweisen. Entsprechend der Gruppen wurden Grenzwerte der LDL-Werte von 100 mg/dl für Risikogruppe 1, über 130 mg/dl bei der Risikogruppe 2, bis hin zu 160 mg/dl für die Risikogruppe 3, festgelegt, bei deren Überschreitung über eine Lebensstiländerung bzw. eine Medikamentöse Behandlung mit Cholesterinspiegelsenkenden Stoffen, wie Statine, welche die Cholesterinsynthese im Körper hemmen, oder Ezetimib, welches die Aufnahme von Cholesterin im Darm hemmt. Diese Richtlinien werden von der DGFF und der Fachgesellschaft der Kardiologen und Internisten unterstützt. Gestützt werden diese Empfehlungen durch zahlreiche Studien, wie etwa Metastudien der American National Heart, Lung and Blood-Institute oder die Framingham-Studie.

Wie so häufig bewirkt auch das gegensätzliche Extrem negative Auswirkungen für die betroffenen Patienten. Dieser zu niedrige Cholesteringehalt im Blut ist meist die Folge von Medikamenten zur Senkung des Cholesterinspiegels, welche in falscher Dosierung oder unter mangelnder ärztlicher Aufsicht eingenommen wurden. Die Folgen äußern sich mannigfaltig und können von erhöhter Gewaltbereitschaft [J. Zhang et al., 2005] und verminderter kognitiver Leistung über eine Häufung von Albträumen bis hin zu Depressionen führen [Suarez, 1999].

90% des im menschlichen Körper befindlichen Cholesterins wird selbst synthetisiert. Nur der geringe Anteil von 10% wird über die Nahrung aufgenommen. Das macht falsche Ernährung zu einem der Hauptfaktoren für einen hohen Cholesterinspiegel. Doch warum ist es so Problematisch wenn wir zu viel Cholesterin zu uns nehmen? Der Körper könnte das überschüssige Cholesterin doch einfach ausscheiden? Um das zu verstehen muss man sich den Transport des Cholesterins im menschlichen Körper anschauen. Es besitzt einen enterohepatischen Kreislauf, den es permanent durchläuft. Dabei wird Cholesterin aus dem Blut von der Leber herausgefiltert und in die Galle abgegeben. Dort wird es in Gallensäure umgewandelt und in den Darm abgegeben. Hier wird es wiederum aufgenommen und gelangt erneut in die Blutbahn. Der Kreislauf beginnt von neuem. Es wird also so gut wie kein Cholesterin durch den Körper ausgeschieden, sondern bewegt sich in einem permanenten Kreislauf durch den Körper. Dabei bildet dieses nur einen 5%igen Anteil. Das restliche Cholesterin befindet sich

innerhalb der Zellen bzw. in dessen Membran. Die zirkulierenden 5% sind mehr oder weniger „überflüssig“ und warten noch auf den Einsatz in den Zellen. Wird jetzt noch mehr Cholesterin durch die Nahrung aufgenommen kann der Körper dies nicht verwenden und bewegt es zusätzlich mit in dem Kreislauf. Dazu synthetisiert er weiter im normalen Maße sein eigenes Cholesterin, sodass der Cholesteringehalt im Blut weiter steigt und Leber und Galle zunehmend belastet werden, da kaum Cholesterin den Körper verlässt.

In der medizinischen Analytik ist dann nur das Cholesterin interessant, welches „überflüssig“ im Blut zirkuliert, also nicht durch Stoffwechselprozesse in den Zellen gebunden ist. Um im Blut transportiert zu werden, wird das Cholesterin mit unterschiedlichen Fettsäuren verestert und an LDL bzw. HDL gebunden.

Für einen Nachweis wird ein Reagenz eingesetzt, in dem verschiedene Enzyme und Stoffe zusammenwirken. Zunächst muss das Cholesterin von der Fettsäure abgespalten werden. Dieser Prozess wird durch eine Cholesterinesterase umgesetzt. Anschließend reagiert das Cholesterin unter Einfluss einer Cholesterinoxidase und Sauerstoff zu Cholesterin-2-on und Wasserstoffperoxid. Eine Peroxidase setzt das Wasserstoffperoxid zusammen mit 4-Aminophenazon und Phenol zu Chinonimin und Wasser um. Das Chinonimin besitzt eine rote Färbung. Durch photometrische Messung lässt sich so aus dem Anstieg und der maximalen OD der Cholesteringehalt der Probe ermitteln.

Dabei gelten vor Allem für die Cholesterinesterase besondere Ansprüche. Am wichtigsten ist ein breites Substratspektrum, um die vielen Cholesterinester im Blut zu spalten und so den korrekten Cholesteringehalt im Blut zu bestimmen. So kann es vorkommen, dass je nach Herkunft der Cholesterinesterase verschiedene Enzyme eingesetzt werden müssen, um das gesamte Substratspektrum abzudecken. Zusätzlich muss das Reagenz so schnell wie möglich arbeiten. Untersucht man hunderte Patientenproben täglich, wie beispielsweise in einem Krankenhaus, rechnen sich schon wenige Minuten, die man pro Test länger braucht, hoch. Doch man darf auch nicht nur von den optimalen Bedingungen ausgehen. Das Reagenz muss auch gewisse physische Belastungen aushalten. Verschiedet man es per Schiff muss man lange Versandzeiten und schwankende Temperaturen im Container einkalkulieren. Im Laderaum eines Flugzeuges herrschen zusätzlich noch Druck und Temperaturschwankungen, vom Einsatz von Trockeneis zur Kühlung über längere Zeiträume ganz zu schweigen. Nach

den Strapazen solcher Reisen muss das Reagenz immer noch voll funktionsfähig beim Verbraucher ankommen. Dieser wird aber nicht alles sofort aufbrauchen, sodass es am besten noch zwei weitere Jahre funktionieren sollte. Zusätzlich sollte das Reagenz auch mit einfachsten Mitteln eingesetzt werden können. Ein Labor in einem ärmeren Land, das nicht so gut ausgestattet ist, sollte den Test genauso gut einsetzen können wie ein neues Labor in einer Industrienation, auch ohne das genaueste Photometer und gefilterter Luft. Das setzt zum einen ein gut funktionierendes Puffersystem voraus, um gewisse Verunreinigungen aus der Umgebung kompensieren zu können, zum anderen muss die Farbreaktion auch bei kleineren Cholesterinmengen deutlich genug ausfallen, um auch von Photometern gemessen werden zu können, die vielleicht nicht unbedingt auf die vierte Kommastelle genau die Extinktion messen können.

## **2 Zielstellung**

Ziel dieser Arbeit ist es, das rekombinante Enzym Cholesterinesterase in der Hefe *Pichia pastoris* in hoher Konzentration zu exprimieren. Dafür werden drei verschiedene Stämme von *Pichia pastoris* eingesetzt und untersucht, da die Expressionsausbeute an rekombinanter Cholesterinesterase je nach verwendetem Stamm unterschiedlich sein kann. Von den erhaltenen Transformanten soll ein Klon mit maximaler rekombinanter Proteinproduktion selektiert werden. Anschließend soll eine Ausbeutesteigerung durch eine Verbesserung des Kultivierungsmediums erreicht und die Langzeitstabilität getestet werden. Darüber hinaus soll die Funktionsfähigkeit und die Stabilität der rekombinanten Cholesterinesterase im Reagenz nachgewiesen werden.

### **3 Material**

#### **3.1 Geräte**

##### **Elektrophorese**

Stromquelle	Biometra - Standard Power Pack P25
Kammer	Biometra - Agagel Maxi

##### **Zentrifuge**

klein	Hettich Zentrifugen - Mikro 22R
groß	Sigma - 6K10
Rotoren	11160
	11144
	12500
Elektroporator	BioRad - MicroPulser
Photometer	Shimadzu - UV-1602 - UV-visible Spectrophotometer
Plattenphotometer	Tecan - Sunrise
Wasserbad	Störk Tronic - WB1
Thermoblock	Kisker Biotech GmbH&Co. KG – Thermo Shaker TS-100C
Inkubator	Infors GmbH - HAT Ecotron
Hitzesterilisator	MMM Medcenter Einrichtung GmbH – Ecocell
Autoklav	Systec - 3150 ELV
UV-Licht	TI1 - Biometra

### 3.2 Chemikalien

50 x TAE			
		für 0,5 l	für 1 l
Tris-HCl	2 M	121,14 g	242,28 g
Essigsäure	1 M	28,6 ml	57,1 ml
			100 ml
EDTA	0,05 M	50 ml 0,5 M Lsg.	0,5 M Lsg.
pH	8,3		

### 3.3 Molekularbiologische Reagenzien

#### LB-Agar+Antibiotikum

20 g/L	LB-BROTH BASE	invitrogen
100 µg/L	Zeocin	invitrogen
16 g/L	Agar-Agar, bakteriologisch	Roth
NEB 5-α - Zellen		New England biolabs
SOC-Medium		New England biolabs
pGAPZαA-COE1 (4362 bp)		zur Verfügung gestellt von HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH
pGAPZαA-COE1-6H (4307 bp)		zur Verfügung gestellt von HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH

#### Puffer P1

20 mL	Puffer P1	Qiagen
50 µL	Rnase (10mg/mL)	Fermentas

#### Puffer P2

Puffer P2	Qiagen
Puffer P3	Qiagen

#### Restriktionsansatz

33 µL	Aqua Dest	
5 µL	10x FastDigest Buffer	Thermo scientific
2 µL	AvrII (XmaII) bzw. BspHI (PagI)	Thermo scientific
10 µL	Minipräp-DNA (2 µg/µL)	

**Agarosegel**

80 mL	Aqua Dest	
1,6 mL	50x TAE	
1%	SeaKem LE Agarose for gelelektroph.	Lonza
GeneRuler 1 kbp DNA Ladder		Fermentas

**Agarosegel-Probe**

8 µL	Aqua Dest	
2 µL	linearisierte DNA-Probe	
2µL	6x TriTrack DNA Loading Dye	Thermo scientific
10000x GelRed Nucleic Acid Gel stain		Biotium
YPD-Medium		Roth
YPD-Agar		Roth
HEPES-Puffer		Sigma
DTT (1,4-Dithiothreit)		Roth
D(-)-Sorbit für die Mikrobiologie		chemolute bio
P.pastoris-Stamm SMD1168H		zur Verfügung gestellt von HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH
P.pastoris-Stamm KM71H		zur Verfügung gestellt von HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH
P.pastoris-Stamm X33		zur Verfügung gestellt von HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH

**Selektiv-Agar**

65 g/L	YPD-Agar
182,2 g/L	Sorbit
100 µg/L	Zeocin

**Selektiv-Medium**

50 g/L	YPD-Medium
100 µg/L	Zeocin

**Reagenz A**

50 mM	4-Nitrophenyl octanoate	Sigma
Lösungsmittel	Acetonitril	Roth

10 mL Cholesterinesterase-Reagenz

10 mL	1x PBS mit Natriumazid	zur Verfügung gestellt von HUMAN Gesellschaft Biochemica und Diagnostica mbH Serva
0,50%	Triton X-100	
100 µL	Reagenz A	

**YNB-Kultivierungsmedium**

1,75 g/L	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1,75 g/L	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
5 g/L	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
2x	YNB (20x Stocklösung)

**FM22-Kultivierungsmedium**

42,9 g/L	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
5 g/L	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
14,9 g/L	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
1 g/L	CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O
14,3 g/L	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
1 mL/L	PTM4-Salzlösung

**PTM4-Salzlösung (sterilfiltriert)**

2 g/L	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O
8 mg/L	KI
3 g/L	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O
0,2 g/L	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O
20 mg/L	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
0,5 g/L	CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O
0,5 g/L	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O
7 g/L	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
22 g/L	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
0,2 g/L	D-Biotin
1 ml/L	konzentrierte H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

**SYN6-Kultivierungsmedium**

1 g/L	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
7,7 g/L	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
0,3 g/L	NaCl
3,3 g/L	KCl
3 g/L	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
27,3 g/L	MES (pH 6.0)



10 mL/L	CaCl <sub>2</sub> -Lösung
10 mL/L	100x Mikroelementelösung
10 mL/L	100x Vitaminlösung
10 mL/L	100x Spurenelementelösung

**CaCl<sub>2</sub>-Lösung**

37,5 g/L      CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O

**100x Mikroelementelösung (steril filtriert)**

2,5 g/L	EDTA (Titrplex III)
2,5 g/L	Ammonium Fe(II) sulphate·6H <sub>2</sub> O
0,2 g/L	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O
0,75 g/L	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
1,0 g/L	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O

**100x Vitaminlösung (steril filtriert)**

2 g/L	Thiamine-HCl
6 mg/L	d-Biotin

**100x Spurenelementelösung (steril filtriert)**

25 mg/L	Nickel(II) sulphate·6H <sub>2</sub> O
25 mg/L	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O
25 mg/L	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
25 mg/L	KI
25 mg/L	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O

**Kontrollseren**

Humatrol N

zur Verfügung gestellt von HUMAN  
Gesellschaft für Biochemica  
und Diagnostica mbH

Humatrol P

zur Verfügung gestellt von HUMAN  
Gesellschaft für Biochemica  
und Diagnostica mbH

Serodos

zur Verfügung gestellt von HUMAN  
Gesellschaft für Biochemica  
und Diagnostica mbH

Serodos plus

zur Verfügung gestellt von HUMAN  
Gesellschaft für Biochemica  
und Diagnostica mbH

Precinorm

zur Verfügung gestellt von HUMAN  
Gesellschaft für Biochemica  
und Diagnostica mbH

Precipath

zur Verfügung gestellt von HUMAN  
Gesellschaft für Biochemica  
und Diagnostica mbH

OCS-L1	zur Verfügung gestellt von HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH
OCS-L2	zur Verfügung gestellt von HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH
PN-L	zur Verfügung gestellt von HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH

### 3.4 Verbrauchsgegenstände

Deepwellplatten riplate sw 5 mL	Roth
Quadratische Petrischalen, PS, steril	Roth
Runde Petrischalen	Roth
Autoklavierbeutel-Entsorgungsbeutel	Roth

## **4 Methoden**

### **4.1 Plasmidpräparation**

#### **4.1.1 Transformation von NEB 5 $\alpha$ -Zellen**

Der LB-Agar+Antibiotikum wurde, wie im Materialteil beschrieben, hergestellt und als Selektionsplatten in runde Petrischalen gegossen. Diese wurden auf 37°C vorgewärmt. Das Mikroreaktionsgefäß mit den kompetenten NEB 5 $\alpha$ -Zellen wurde für 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Zellsuspension leicht gevortext und 25  $\mu$ L vorsichtig in ein neues 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß auf Eis überführt. Dazu wurden 2  $\mu$ L Plasmid-DNA hinzugefügt. Die Plasmid-DNA-Konzentration sollte zwischen 1 pg und 100 ng liegen. Das Mikroreaktionsgefäß wurde vorsichtig angeschnipst, um DNA und Zellen zu vermischen. Dieses Gemisch wurde anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Ein Hitzeschock erfolgte durch Inkubation für 30 sec bei 42°C. Nach weiteren 5 min auf Eis wurden 200  $\mu$ L auf RT temperiertes SOC-Medium hinzugefügt. Die Suspension wurde für 60 min bei 250 rpm und 37°C inkubiert. Vor dem Ausplattieren wurde das Mikroreaktionsgefäß mehrfach invertiert. Je Selektionsplatte wurden 50  $\mu$ L des Transformationsansatzes auf die Oberfläche pipettiert und mithilfe eines Drigalskispatels gleichmäßig auf der Oberfläche des LB-Agar-Mediums verteilt. Diese wurden ÜN bei 37°C inkubiert.

#### **4.1.2 DNA Minipräparation**

Die Grundlage bildete eine 2 mL *E. coli* ÜN-Kultur. Diese wurde bei 37°C und 250 rpm in LB-Medium inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Suspension in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und für 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Das Pellet wurde mit 200  $\mu$ L kaltem Puffer P1 resuspendiert und gevortext. Nach Zugabe von 200  $\mu$ L des Puffers P2 wurde das Gemisch 3 min bei RT stehen gelassen. Anschließend wurden 200  $\mu$ L des Puffers P3

hinzugefügt und das Mikroreaktionsgefäß mehrfach invertiert. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 13.00 rpm und 4°C. Vom Überstand wurden 500 µL in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Zu diesem Überstand wurden 350 µL Isopropanol hinzugefügt und invertiert. Nach 2 min erfolgte eine weitere Zentrifugation für 25 min bei 13.000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde verworfen. Das entstandene Pellet wurde mit 500 µL 70%igem Ethanol gewaschen. Es folgte eine Zentrifugation für 3 min bei 13.000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde verworfen. Dieser Waschschrift wurde wiederholt. Zum Trocknen wurde das Mikroreaktionsgefäß über Kopf auf Fließpapier gestellt. Nach negativer Riechprobe, das Pellet riecht nicht mehr nach Ethanol, wurde die DNA in 50 µL A. dest resuspendiert.

Zur Ermittlung der DNA-Konzentration wurde die Extinktion bei 260 nm einer 1:100 Verdünnung der DNA-Lösung gegen A. dest im Photometer ermittelt.

## **4.2 Transformation von DNA in Hefe**

### **4.2.1 DNA Restriktion und Reinigung**

Der Restriktionsansatz wurde wie im Materialteil beschrieben in einem 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß hergestellt. Es wurde *AvrII* bzw. *BspHI* als Restriktionsenzym eingesetzt. Der Ansatz wurde 2 h bei 37°C inkubiert.

Zur Reinigung der linearisierten Plasmid-DNA wurde die Ethanolfällung eingesetzt. Der Restriktionsansatz wurde nach der Inkubation mit 5 µL 3M Natriumacetat (pH 5,2) und mit 110 µL -20°C kaltem 93%igem Ethanol gemischt. Das Gemisch wurde 10 min bei -20°C gelagert und anschließend bei 14.000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Es folgten zwei Waschschriffe. Dabei wurde 1 mL -20°C kalter 70%iger Ethanol eingesetzt. Das Mikroreaktionsgefäß wurde mehrmals invertiert und für 3 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach den beiden Waschschriffen wurde mit 1mL 90%igem, -20°C kaltem Ethanol gewaschen. Nach der Zentrifugation (14.000 rpm, 4°C, 3 min) wurde der Überstand verworfen und letzte Ethanolreste durch zentrifugieren und Abnahme mithilfe einer Pipette entfernt. Das Mikroreaktionsgefäß wurde zum Trocknen offen stehen gelassen. Als kein

Ethanolgeruch mehr am Mikroreaktionsgefäß wahrnehmbar war, wurde das Pellet in 25 µL A. dest resuspendiert.

#### **4.2.2 Agarosegelelektrophorese**

Das Agarosegel und die aufzutragende DNA-Probe wurden, wie im Materialteil beschrieben, hergestellt. Das Agarosegel wurde zunächst bei 100 °C so lange erhitzt, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hat. Das Gemisch wurde auf ca. 50°C abgekühlt, bevor es dann in die entsprechende Form gegossen wurde. Die Probe und der 1 kbp DNA-Ladder wurden in die dafür vorgesehenen Taschen im Agarosegel pipettiert. Die Gelelektrophoresekammer wurde mit 120 V und einem 1x TAE-Puffer als Laufpuffer betrieben. Der Prozess wurde gestoppt, als die erste, farbige Bande des Ladungspuffers und der DNA-Ladder den unteren Rand des Gels erreicht hatten. Das Gel wurde 30 min in eine 1x GelRed-Färbelösung gelegt. Unter UV-Licht konnten die DNA-Banden nun sichtbar gemacht werden.

#### **4.2.3 Herstellung elektrokompetenter Hefezellen**

Als Grundlage war eine Reihe von Vorkulturen erforderlich. Es wurden 5 mL YPD-Medium in einem 100 mL Kolben mit 50 µL einer Hefesuspension beimpft und ÜN bei 30°C und 240 rpm inkubiert. Nach 16 h wurde mit 100 µL dieser Kultur ein weiterer 100 ml Kolben mit 10 mL YPD-Medium beimpft. Dieser wurde für weitere 8 h bei 30°C und 240 rpm inkubiert. Mit 10µL dieser zweiten Kultur wurde ein 500 mL Kolben mit 50 mL YPD-Medium beimpft und ÜN bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Die Kultur wurde so lange inkubiert, bis die Suspension eine OD<sub>600nm</sub> zwischen 0,8 und 1,5 aufwies. Sie wurde in ein 50 mL Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 3000 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 5 mL YPD-Medium mit 1M HEPES (pH 5,2) und 0,125 mL 1M DTT resuspendiert. Das entstandene Gemisch wurde 15 min bei 30°C inkubiert. Das Zentrifugationsröhrchen wurde mit eis-kaltem 1M Sorbit bis auf 50 mL aufgefüllt. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 3000 rpm und 4°C wurde das Pellet zwei weitere Male mit 1M Sorbit gewaschen und zentrifugiert, wobei der Überstand jeweils verworfen wurde. Als letzter

Schritt wurde das Pellet in 0,5 mL 1M Sorbit resuspendiert, und die Suspension zu je 80 µL in 1,5 mL Mikroreaktionsgefäße aliquotiert. Die Aliquots wurden schrittweise ÜN bei -20°C, dann bei -80°C gekühlt.

#### **4.2.4 Elektroporation**

Vor jeder Transformation wurde mithilfe einer Agarosegelelektrophorese überprüft, ob das Plasmid korrekt von dem verwendeten Restriktionsenzym linearisiert wurde. Der nach der Elektroporation eingesetzte Selektiv-Agar wurde wie im Materialteil beschrieben hergestellt. Dabei war darauf zu achten, dass das Zeocin erst kurz vor dem Gießen der Platten dazu gegeben wurde, da es hitzeempfindlich ist. Die verwendeten Platten waren quadratische Petrischalen.

Bei der Elektroporation wurden 8 µg DNA eingesetzt, bis zu 10 µg könnten eingesetzt werden. Die DNA wurde zu den gefrorenen Zellen gegeben, sodass diese auf Eis mit der DNA zusammen aufgetaut sind. Das Gemisch wurde nach dem Auftauen in eine bei -20°C gelagerte Elektroporationskuvette gegeben. Dabei war darauf zu achten, dass der Kontakt zu beiden Elektroden der Kuvette durch die Suspension hergestellt war. Der Elektroporator wurde auf die Einstellungen „Fungi“ – „Pic“ gesetzt. Dies entspricht 2000 V für 5 msec. Es wurde einmal der „Pulse“ aktiviert. In die Kuvette wurde 1 mL YPD-Sorbitol mit 1M Sorbitol gegeben und in ein 2 mL Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden für 2 h bei 30°C inkubiert. Die Selektionsplatten wurden auf RT erwärmt. Nach der Inkubation wurden von der Suspension je 500 µL auf eine Selektionsplatte gegeben und mithilfe eines Drigalskispatels auf dem Medium verteilt. Dabei war darauf zu achten, dass die gesamte Flüssigkeit eingezogen ist, bevor die Inkubation beginnen konnte. Die Selektionsplatten wurden, je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Transformanden, 3-4 Tage bei 30°C im Brutschrank inkubiert.

### **4.3 Kultivierung der erhaltenen Transformanden**

#### **4.3.1 Kultivierung in einer 48er Deep-well Platte**

Das Selektiv-Medium wurde wie im Materialteil beschrieben hergestellt. Es war darauf zu achten, dass das Zeocin erst zu dem YPD-Medium gegeben wurde, als dieses abgekühlt war, da das Antibiotikum hitzeempfindlich ist.

Die Deep-well Platten wurden in Autoklavierbeuteln autoklaviert, um Sie zu sterilisieren. Die einzelnen Wells wurden mit je 1 mL des flüssigen Selektivmediums befüllt. Es wurden mit Hilfe steriler Pipettenspitzen einzelne, ausgewählter Kolonien in je ein Well überführt. Die Platte wurde mithilfe einer semipermeablen Membran verschlossen und bei 30°C und 260 rpm für 48h inkubiert.

#### **4.3.2 Kultivierung im Schüttelkolben**

Je nach benötigtem Endvolumen der Zellsuspension wurde, wenn nicht anders beschrieben, stets in folgender Reihenfolge kultiviert:

Ein 100 mL Kolben wurde mit 5 mL YPD-Medium befüllt und mit 50 µL Zellsuspension beimpft. Die Inkubation erfolgte ÜN bei 240 rpm und 30°C. Davon wurden 100 µL eingesetzt, um in einem zweiten 100 mL Kolben mit 10 mL YPD-Medium beimpft. Die Inkubation erfolgte bei gleichen Parametern ÜN. Für 50 mL Zellsuspension wurde ein 500 mL Kolben eingesetzt und mit 50 mL YPD-Medium befüllt. Dieses wurde mit 500 µL aus der vorhergehenden Kultivierung beimpft und für 72h bei 200 rpm und 30°C inkubiert.

## **4.4 Screening der Kulturüberstände**

### **4.4.1 Messung in 96er-well Platte**

Es wurde eine kultivierte Deep-well Platte verwendet. Dabei wurden die Transformanten in 1 mL Selektionsmedium für 2 Tage bei 260 rpm und 30°C inkubiert. Das Cholesterinesterase-Reagenz wurde wie im Materialteil beschrieben hergestellt. Von den 96-Well der Platte wurden nur 48-Well eingesetzt.

Die Deep-well Platte mit kultivierten Hefeklonen wurde bei 3500 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Je 5 µL des Kulturüberstandes eines Deep-wells wurden in ein Well der 96er Platte überführt. Mithilfe einer Mehrkanalpipette wurden in jedes Well möglichst schnell je 195 µl des Cholesterinesterase-Reagenzes pipettiert werden. Die Platte wurde in einen Tecan Reader gestellt. Die Extinktion bei 405 nm wurde jede Minute für 5 min gemessen. Vor jeder Messung wurde die Platte durch das Gerät 3 sec lang geschüttelt.

### **4.4.2 Messung in der Küvette**

Das Cholesterinesterase-Reagenz wurde wie im Materialteil beschrieben hergestellt. Es wurden ausschließlich Kulturüberstände inkubierter Kulturen verwendet. Die Kulturüberstände wurden bei 3500 rpm für 5 min zentrifugiert. Dieser wurde mit einem 0,45 µm Filter sterilfiltriert.

Von den Kulturüberständen wurde eine 1:10 Verdünnung angefertigt. Davon wurden 10 µL in eine Küvette gegeben. Die Küvette wurde in das Photometer gestellt. Als Referenz diente das Cholesterinesterinesterase-Reagenz. Bevor das Reagenz zu der Probe gegeben wurde, wurde es auf 37°C vorgewärmt. In die Küvette mit der Probe wurden 990 µL des Reagenzes gegeben. Durch einmaliges hoch und runter pipettieren wurde das Reagenz mit der Probe vermischt und die Messung so schnell wie möglich gestartet wird. Es wurde für 5 min alle 30 sec die Extinktion bei 400 nm gemessen.



#### **4.5 Medientest**

Für den Medientest 1 wurden drei verschiedene Medien zur Kultivierung eines Klons eingesetzt. Die Medien FM22, YNB und SYN6 sind wie im Materialteil beschrieben zusammengesetzt. Ein ausgewählter Klon wurde dann in drei 500 mL Kolben mit je 50 mL des Mediums für 3 Tage bei 30°C und 240 rpm kultiviert. Nach der Kultivierung wurde die Suspension bei 3000 xg für 10 min zentrifugiert. Der ÜS wurde durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert und die Enzymaktivität mithilfe der beschriebenen Messmethode in einer Küvette ermittelt.

#### **4.6 Langzeitstabilitäts-Test**

Es wurde ein Klon in 50 mL SYN6-Medium in einem Schüttelkolben für drei Tage bei 30°C und 240 rpm kultiviert. Es wurden drei Ansätze getätigt, wobei die CaCl<sub>2</sub>-Konzentration mit 0%, 0,1% und 1% variiert wurde. Nach der Kultivierung wurden die Suspensionen bei 3000 xg für 10 min zentrifugiert. Die ÜS wurden durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert.

Die ÜS wurden zu je 10 ml aliquotiert. Bei jedem Ansatz wurden die Aliquots mit verschiedenen Zusätzen versehen. Ein Aliquot wurde ohne jegliche Zusätze belassen. Ein weiteres wurde mit 1% RSA versetzt, ein weiteres mit 1% RSA und 5% Glycerin. Die anderen zwei Aliquots wurden zum einen mit 1% RSA und 2mM Magnesiumsulfat-Heptahydrat, zum anderen mit 1% RSA und 0,5 mM EDTA-Disodium versetzt.

Die Enzymaktivität der einzelnen Aliquots wurde wöchentlich gemessen, wobei der Startwert direkt nach dem Ansetzen der einzelnen Lösungen ermittelt wurde. Die Messungen wurden nach der Methode in der Küvette durchgeführt.

#### **4.7 Reagenztest**

Für die Durchführung des Reagenztestes wurde zunächst das Basis-Reagenz wie im Materialteil beschrieben hergestellt. Dazu wurde anschließend eine selbst hergestellte Cholesterinesterase-Lösung eingesetzt. Die Aktivität im fertigen Reagenz musste dabei > 150 U/L betragen. Zum Test des Reagenzes wurde der HumaStar 600 eingesetzt. Dieser misst mithilfe eines Photometers die Kinetik der Reaktion, die abläuft wenn

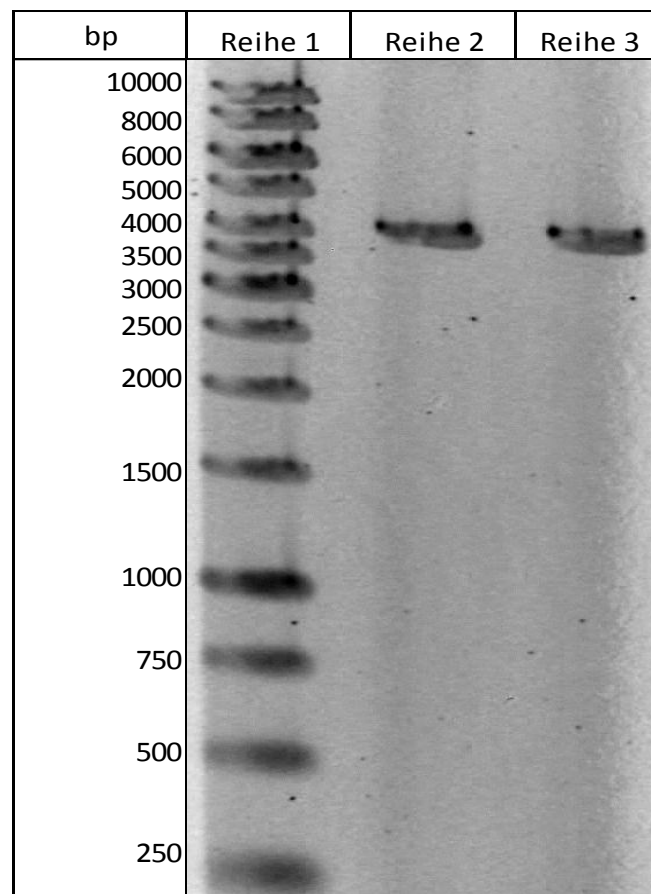
Kontrollserum zum Reagenz hinzugegeben wird. Mithilfe einer bestimmten Formel wird automatisch die Konzentration an Cholesterin in der Probe berechnet.

Zum Testen des selbst hergestellten Reagenzes wurden spezielle Kontrollseren eingesetzt (siehe Materialteil), welche eine definierte Konzentration verschiedenster Cholesterine enthält, um gleichzeitig auch das Substratspektrum zu testen.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Kontrollagarosegel

Die folgende Abbildung zeigt ein Agarosegel zur Kontrolle der Linearisierung von Plasmid DNA vor deren Transformation in *P. pastoris*. In Reihe 1 befindet sich der DNA-Ladder als Größenmarker zur Kontrolle der entstandenen DNA Banden nach spezifischer Restriktion. Reihe 2 enthält das durch das Restriktionsenzym *AvrII* linearisierte Plasmid pGAPZ $\alpha$ A-COE1 (4362 bp). In Reihe 3 ist das *BspHI* linearisierte Plasmid pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H (4307 bp) zu sehen.



**Abbildung 1 – Kontrollagarosegel. In Reihe 1 befindet sich die DNA-Ladder als Größenmarker, in Reihe 2 das *AvrII* linearisierte pGAPZ $\alpha$ A-COE1 (4362 bp) –Plasmid, in Reihe 3 das *BspHI* linearisierte pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H**

## 5.2 Transformation von *Pichia pastoris*

### 5.2.1 pGAPZαA-COE1

In Tabelle 1 sind die Transformandenzahlen vermerkt, die sich nach der Transformation mit pGAPZαA-COE1 ergeben haben. Dabei wurde zwischen den beiden Restriktionsenzymen *AvrII*, in Spalte 1, und *BspHI*, in Spalte 2, unterschieden, mit denen die Plasmid-DNA vor der Transformation linearisiert wurde.

**Tabelle 1 - Transformandenzahlen der drei Stämme - Plasmid pGAPZαA-COE1 linearisiert mit *AvrII* bzw. *BspHI***

	<i>AvrII</i>	<i>BspHI</i>
SMD1168H	1220	1628
KM71H	82	394
X33	808	1032

Die Transformationseffizienz berechnet sich wie folgt:

$$\frac{\text{Anzahl der Transformanden}}{\mu\text{g eingesetzte DNA}}$$

Es wurden für jede Transformation 8 µg pGAPZαA-COE1 Plasmid-DNA eingesetzt. Daraus ergeben sich in der folgenden Tabelle 2 die Transformationseffizienzen in Abhängigkeit vom jeweiligen Restriktionsenzym, mit welchem die Plasmid-DNA vor der Transformation linearisiert wurde:

**Tabelle 2 - Transformationseffizienzen der verschiedenen Transformationsansätze – Es wurden 8 µg pGAPZαA Plasmid-DNA eingesetzt**

pGAPZαA-COE1		Transformationseffizienz $\left(\frac{\text{Zellen}}{\mu\text{g Plasmid}}\right)$ mit <i>AvrII</i>	Transformationseffizienz $\left(\frac{\text{Zellen}}{\mu\text{g Plasmid}}\right)$ mit <i>BspHI</i>
	SMD1168H	153	204
	KM71H	10	49
	X33	101	129

In Abbildung 2 und -3 sind die COE-Aktivitäten der ÜS einer inkubierten 48er Deepwell Platte abgebildet. Es wurden die Klone SMD1168H/pGAPZαA-COE1 kultiviert. Dabei wurden die Klone in Abbildung 2 mit *AvrII* linearisierter Plasmid-DNA erzeugt,

jene in Abbildung 3 mit *BspHI* linearisierter Plasmid-DNA. Der Klon A1 in Abbildung 2 war ein nicht transformierter Klon, welcher als Referenz eingesetzt wurde. Die grün markierten Klone wurden für eine weiter Kultivierung in einem 100 mL Schüttelkolben mit 5 mL Selektiv-Medium eingesetzt.

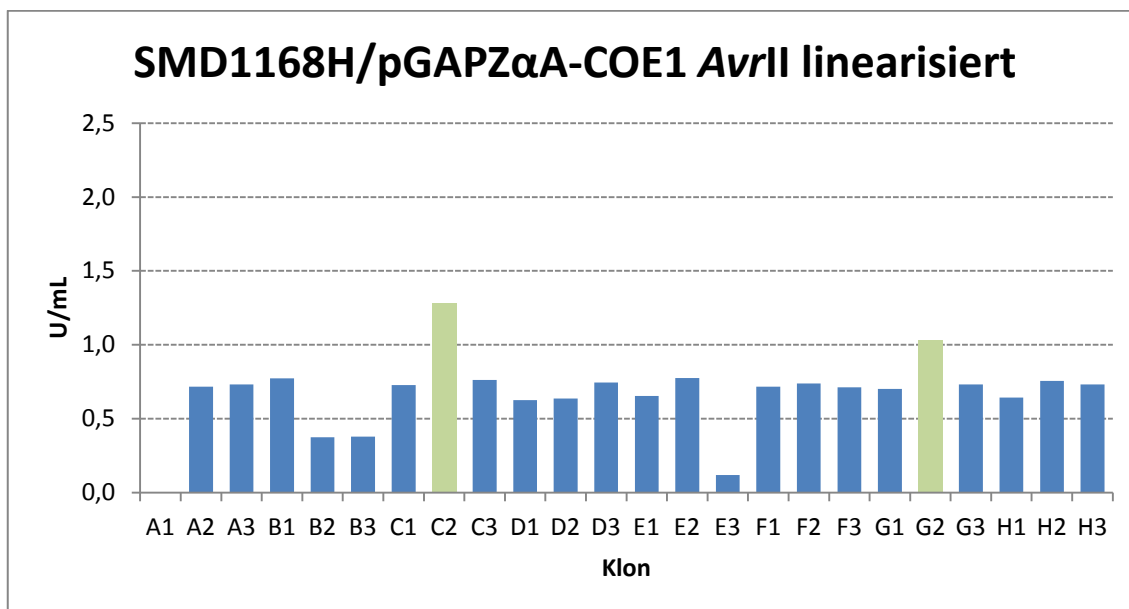


Abbildung 2 - Messung der ÜS aus der 48er Deep-well Platte auf COE-Aktivität. SMD1168H/pGAPZ $\alpha$ A-COE1 Klone wurden mit *AvrII* linearisierter Plasmid-DNA transformiert

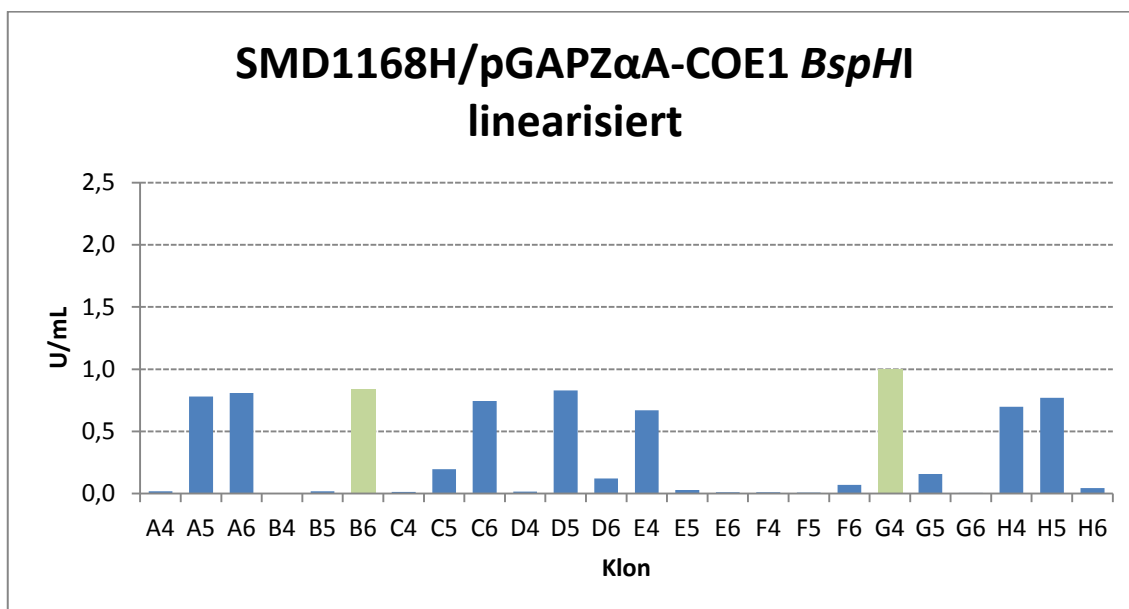


Abbildung 3 - Messung der ÜS aus der 48er Deep-well Platte auf COE-Aktivität. SMD1168H/pGAPZ $\alpha$ A-COE1 Klone wurden mit *BspHI* linearisierter Plasmid-DNA transformiert

In Abbildung 4 und -5 sind die COE-Aktivitäten der ÜS einer inkubierten 48er Deep-well Platte abgebildet. Es wurden die Klone KM71H/pGAPZ $\alpha$ A-COE1 kultiviert. Dabei wurden die Klone in Abbildung 4 mit *AvrII* linearisierter Plasmid-DNA erzeugt, jene in Abbildung 5 mit *BspHI* linearisierter Plasmid-DNA. Der Klon A1 in Abbildung 4 war ein nicht transformierter Klon, welcher als Referenz eingesetzt wurde. Die grün markierten Klone wurden für eine weiter Kultivierung in einem 100 mL Schüttelkolben mit 5 mL Selektiv-Medium eingesetzt.

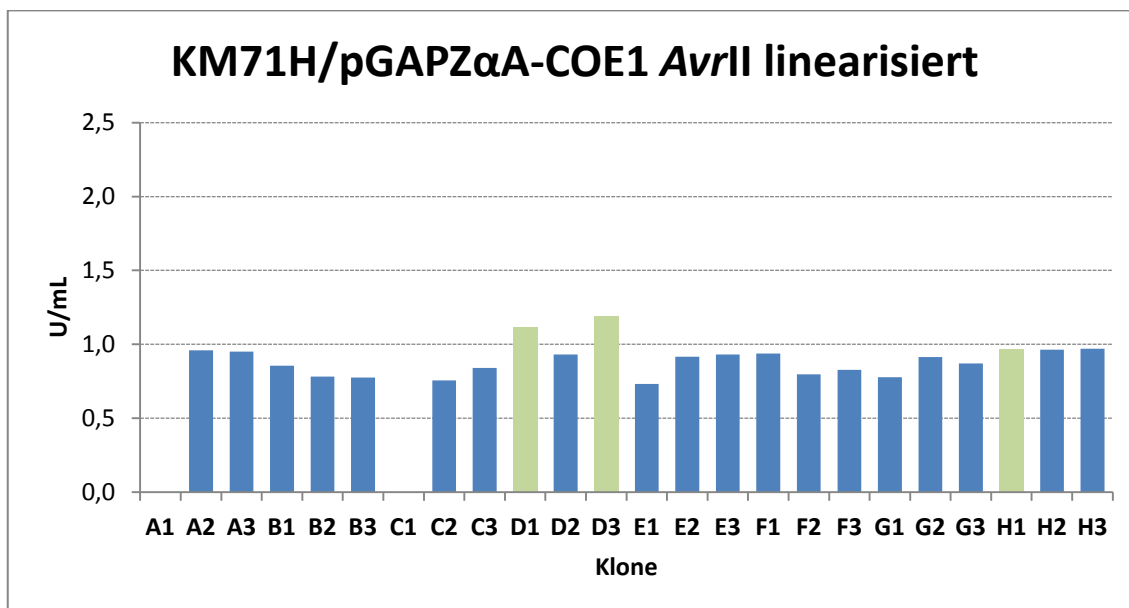


Abbildung 4 - Messung der ÜS aus der 48er Deep-well Platte auf COE-Aktivität. KM71H/pGAPZ $\alpha$ A-COE1 Klone wurden mit *AvrII* linearisierter Plasmid-DNA transformiert.

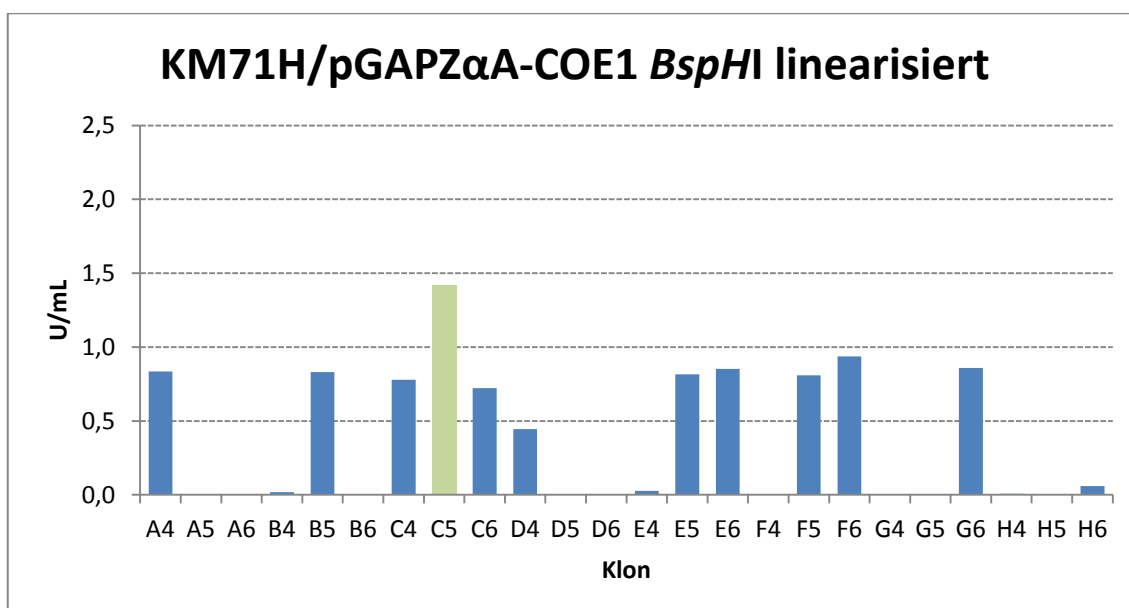


Abbildung 5 - - Messung der ÜS aus der 48er Deep-well Platte auf COE-Aktivität. KM71H/pGAPZ $\alpha$ A-COE1 Klone wurden mit *BspHI* linearisierter Plasmid-DNA transformiert.

In Abbildung 6 und -7 sind die COE-Aktivitäten der ÜS einer inkubierten 48er Deep-well Platte abgebildet. Es wurden die Klone X33/pGAPZ $\alpha$ A-COE1 kultiviert. Dabei wurden die Klone in Abbildung 6 mit *AvrII* linearisierter Plasmid-DNA erzeugt, jene in Abbildung 7 mit *BspHI* linearisierter Plasmid-DNA. Der Klon A1 in Abbildung 6 war ein nicht transformierter Klon, welcher als Referenz eingesetzt wurde. Die grün markierten Klone wurden für eine weiter Kultivierung in einem 100 mL Schüttelkolben mit 5 mL Selektiv-Medium eingesetzt.

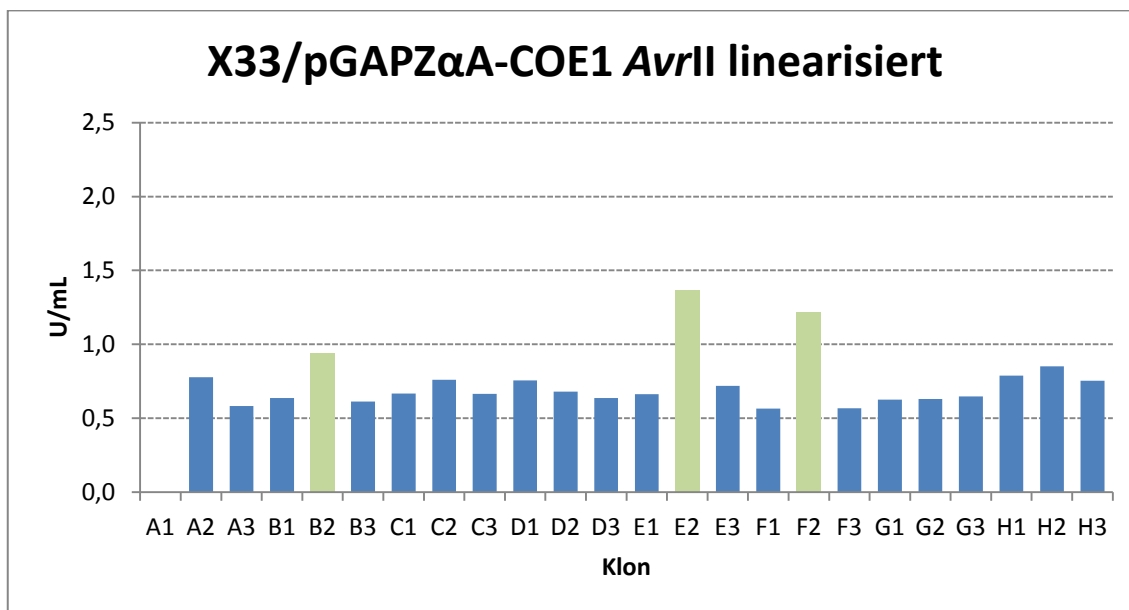


Abbildung 6 - Messung der ÜS aus der 48er Deep-well Platte auf COE-Aktivität. X33/pGAPZ $\alpha$ A-COE1 Klone wurden mit *AvrII* linearisierter Plasmid-DNA transformiert.

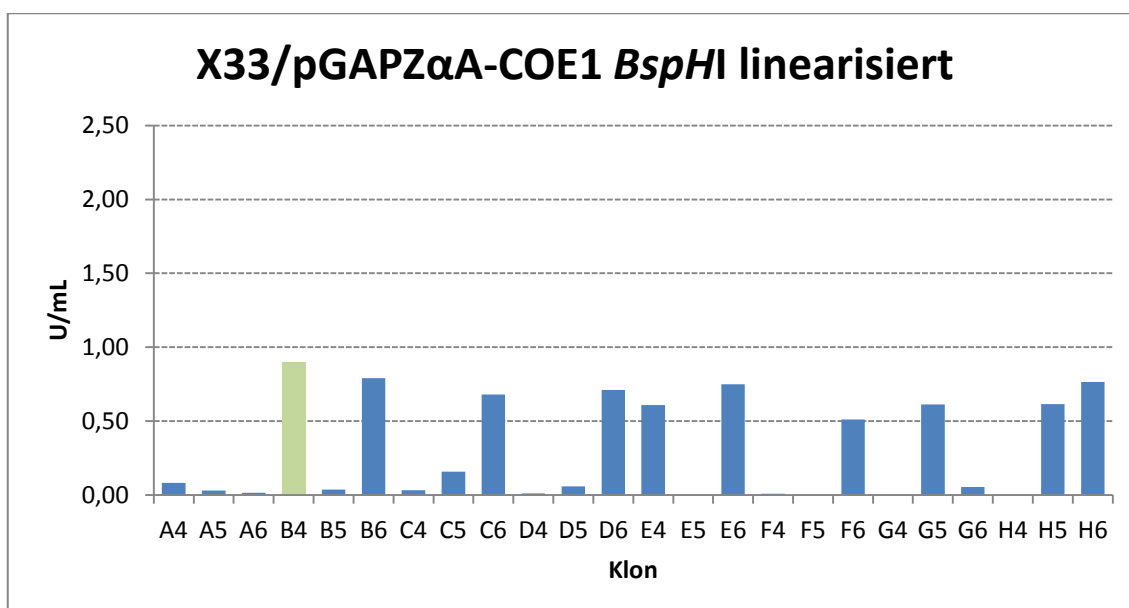


Abbildung 7 - Messung der ÜS aus der 48er Deep-well Platte auf COE-Aktivität. X33/pGAPZ $\alpha$ A-COE1 Klone wurden mit *BspHI* linearisierter Plasmid-DNA transformiert.

In Tabelle 3 sind jene Klone abgebildet, welche nach dem Vorscreening in der 48er Deep-well Platte für eine weitere Inkubation in einem 100 mL Schüttelkolben mit 5 mL Selektiv-Medium ÜN bei 30°C und 240 rpm ausgewählt wurden. Die Überstände wurden anschließend auf Enzymaktivität hin überprüft und diese gemessen.

**Tabelle 3 – Ermittlung der Enzymaktivität ausgewählter Klone mit dem Konstrukt pGAPZαA-COE1 nach Inkubation ÜN in einem 100 mL Schüttelkolben mit 5 mL Selektiv-Medium**

	Klon	Enzymaktivität in U/mL
SMD1168H/pGAPZαA-COE1	C2	4,3
	G2	3,6
	G4	2,2
	B6	0,1
KM71H/pGAPZαA-COE1	C5	4,3
	D3	3,7
	D1	5,2
	H1	2,7
X33/pGAPZαA-COE1	B2	3,7
	B4	2,5
	E2	4,8
	F2	6,2

Die Enzymaktivität wird dabei wie folgt berechnet:

$$\left( \frac{\frac{E(5 \text{ min}) - E(1 \text{ min})}{4} * VG * DF}{EK * VE} \right) / 1000 = U/mL$$

- E(5 min) - Extinktion (400 nm) bei 5 min
- E(1 min) - Extinktion (400 nm) bei 1 min
- VG - Gesamtvolumen des Messansatzes
- DF - Verdünnungsfaktor
- EK - Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol
- VE - Volumen an eingesetztem Enzym



### 5.2.2 pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H

In Tabelle 1 sind die Transformanzahlen vermerkt, die sich nach der Transformation mit pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H ergeben haben. Dabei wurde die Plasmid-DNA mithilfe des Restriktionsenzymes *AvrII* vor der Transformation linearisiert.

**Tabelle 4 - Transformanzahlen der drei Stämme - Plasmid pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H linearisiert mit *AvrII***

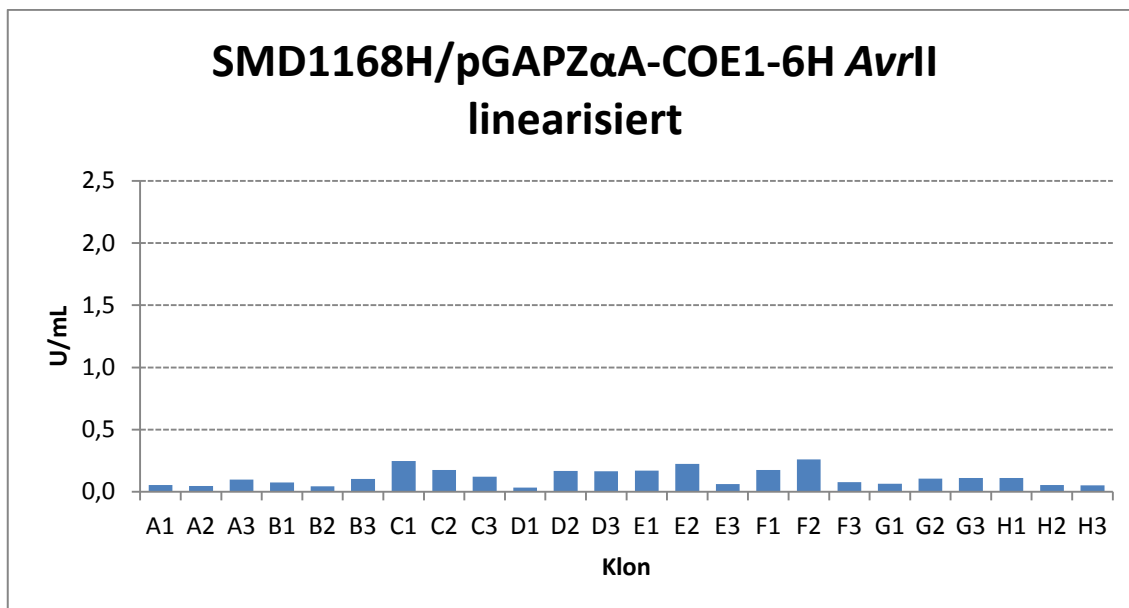
	<i>AvrII</i>
SMD1168H	2812
KM71H	84
X33	2160

Die Transformationseffizienz wurde wie im Kapitel pGAPZ $\alpha$ A-COE1 beschrieben ermittelt. Daraus ergeben sich in Tabelle 5 die Transformationseffizienzen. Es wurden stets 8  $\mu$ g linearisierter Plasmid-DNA eingesetzt.

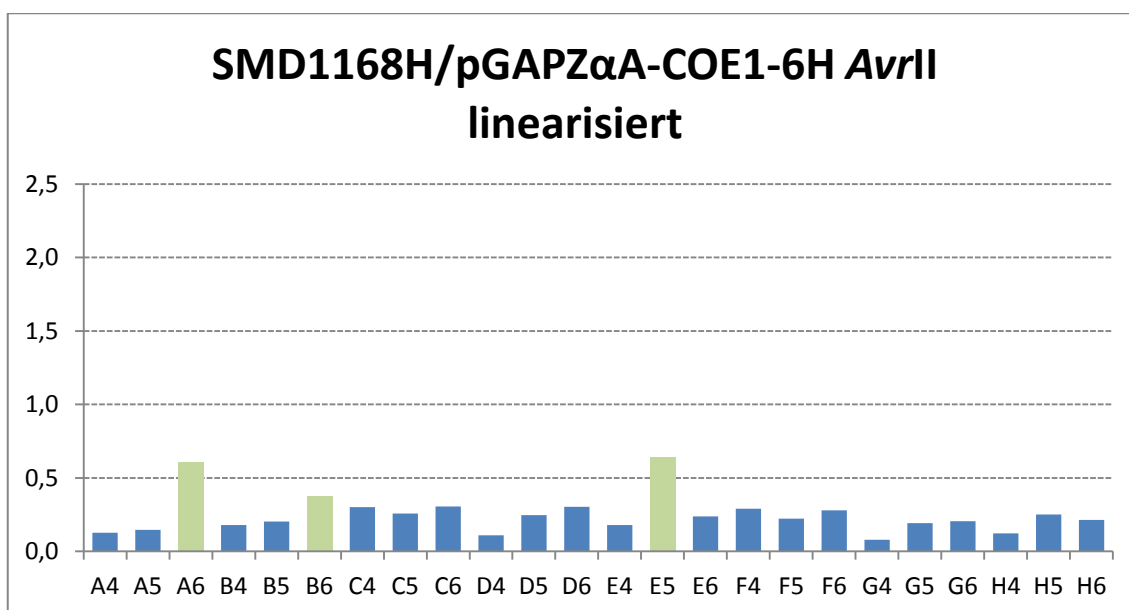
**Tabelle 5 - Transformationseffizienzen der verschiedenen Transformationsansätze – Es wurden 8  $\mu$ g pGAPZ $\alpha$ A Plasmid-DNA eingesetzt**

pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H		Transformationseffizienz $\left(\frac{\text{Zellen}}{\mu\text{g Plasmid}}\right)$ mit <i>AvrII</i>
	SMD1168H	351
	KM71H	11
	X33	270

In Abbildung 8 und -9 sind die COE-Aktivitäten der ÜS einer inkubierten 48er Deepwell Platte abgebildet. Es wurden die Klone SMD1168H/pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H kultiviert. Dabei wurden die Klone in beiden Abbildungen 8 und -9 mit *AvrII* linearisierter Plasmid-DNA erzeugt wurden. Die grün markierten Klone wurden für eine weiter Kultivierung in einem 100 mL Schüttelkolben mit 5 mL Selektiv-Medium eingesetzt.

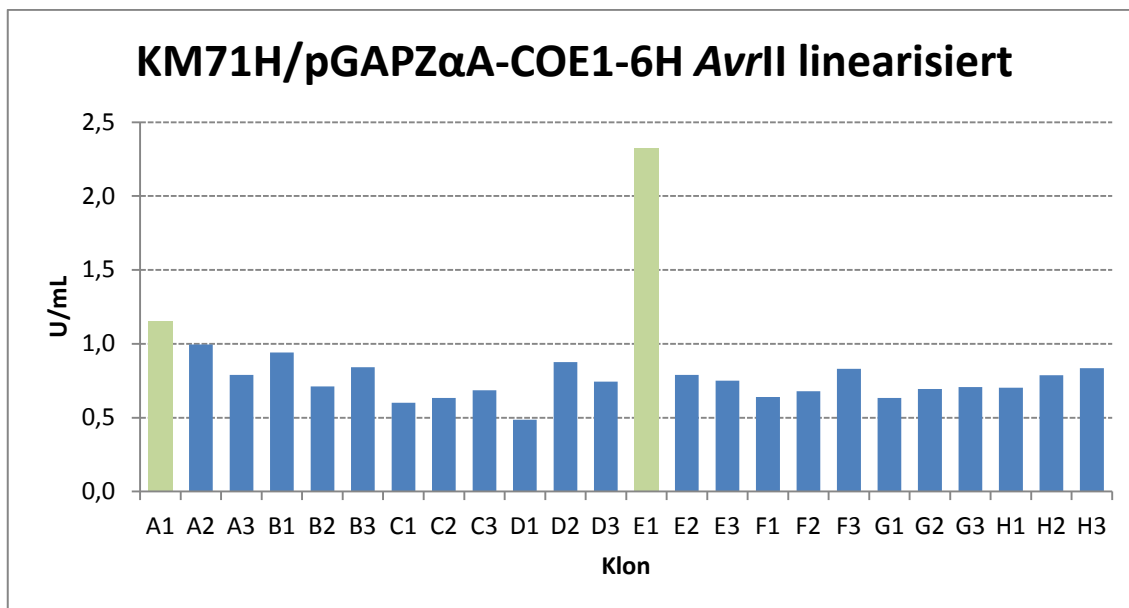


**Abbildung 8 - Messung der ÜS aus der 48er Deep-well Platte auf COE-Aktivität.**  
SMD1168H/pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H Klone wurden mit *AvrII* linearisierter Plasmid-DNA transformiert

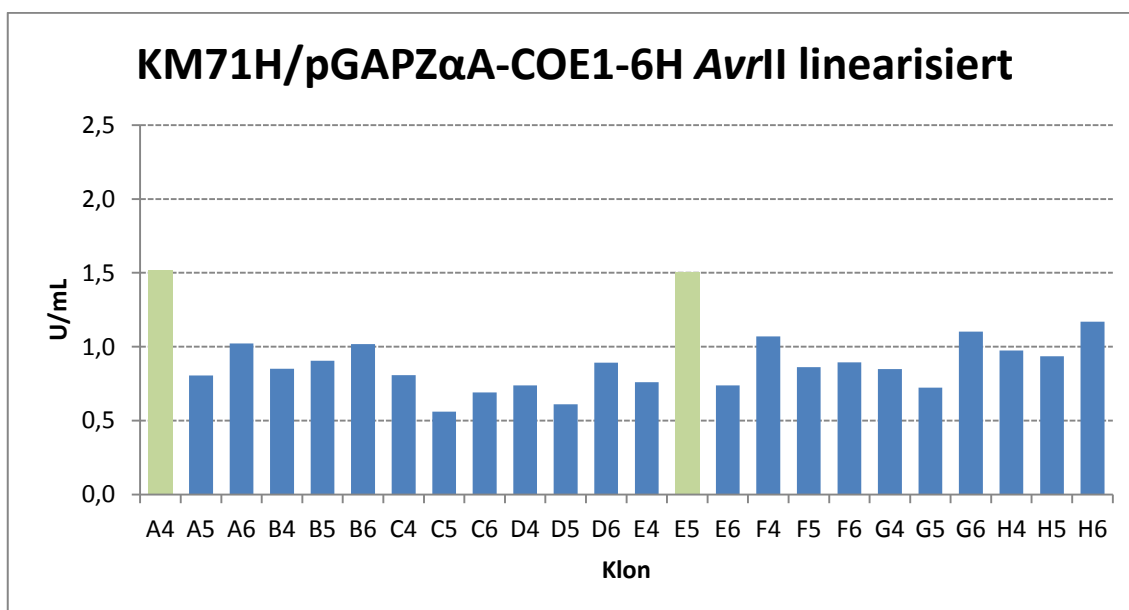


**Abbildung 9 - Messung der ÜS aus der 48er Deep-well Platte auf COE-Aktivität.**  
SMD1168H/pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H Klone wurden mit *AvrII* linearisierter Plasmid-DNA transformiert

In Abbildung 10 und -11 sind die COE-Aktivitäten der ÜS einer inkubierten 48er Deep-well Platte abgebildet. Es wurden die Klone KM71H/pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H kultiviert. Dabei wurden die Klone in beiden Abbildungen 10 und -11 mit *AvrII* linearisierter Plasmid-DNA erzeugt wurden. Die grün markierten Klone wurden für eine weiter Kultivierung in einem 100 mL Schüttelkolben mit 5 mL Selektiv-Medium eingesetzt.

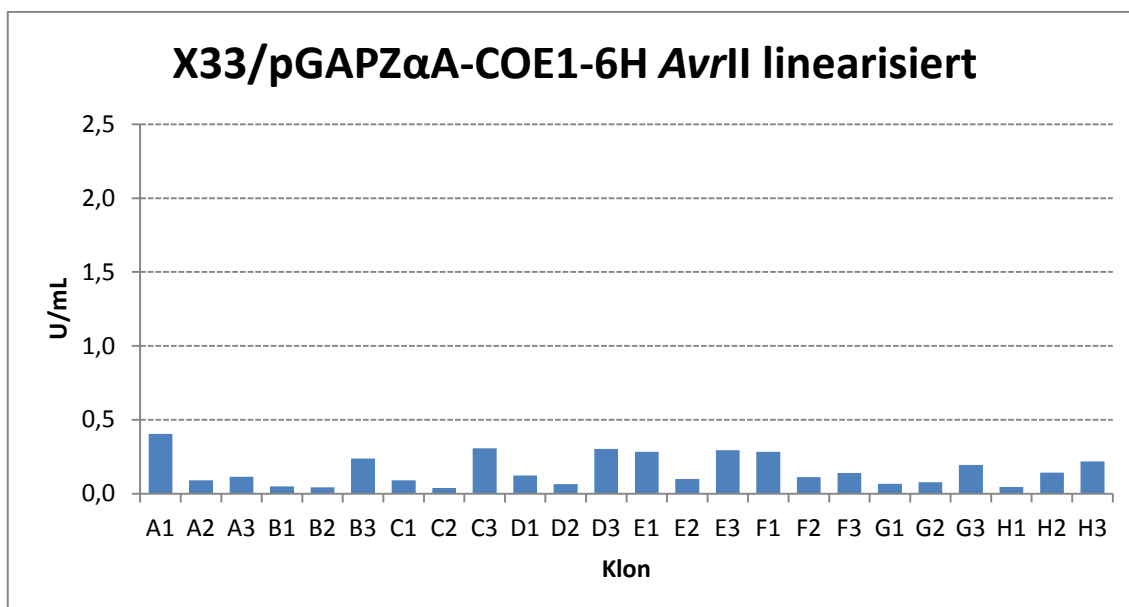


**Abbildung 10 - Messung der ÜS aus der 48er Deep-well Platte auf COE-Aktivität.**  
**KM71H/pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H Klone wurden mit *AvrII* linearisierter Plasmid-DNA transformiert**

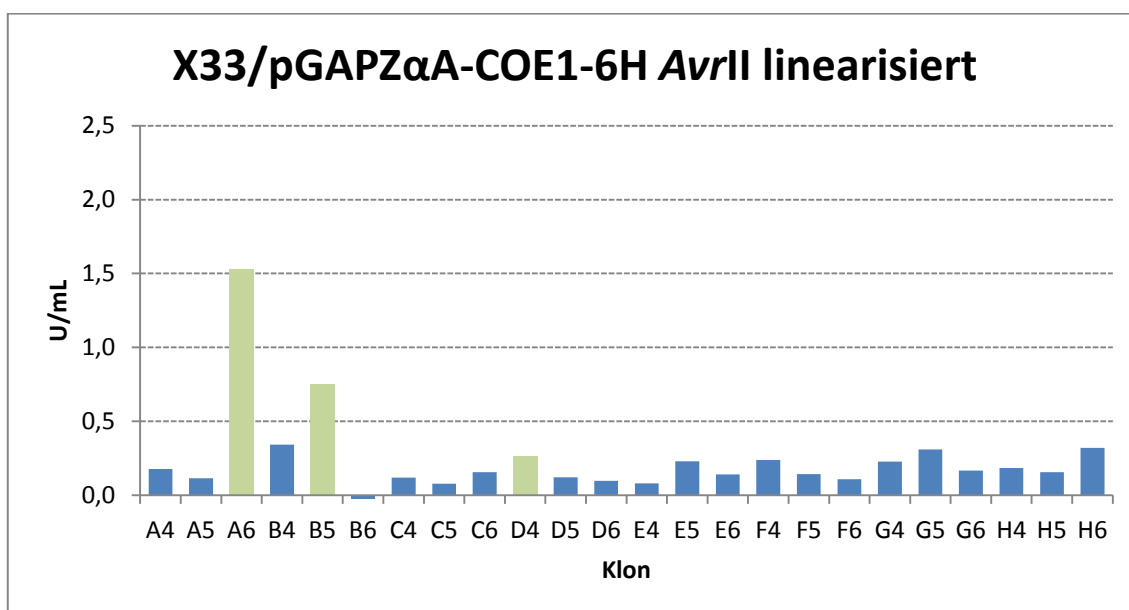


**Abbildung 11 - Messung der ÜS aus der 48er Deep-well Platte auf COE-Aktivität.**  
**KM71H/pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H Klone wurden mit *AvrII* linearisierter Plasmid-DNA transformiert**

In Abbildung 12 und -13 sind die COE-Aktivitäten der ÜS einer inkubierten 48er Deep-well Platte abgebildet. Es wurden die Klone X33/pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H kultiviert. Dabei wurden die Klone in beiden Abbildungen 12 und -13 mit *AvrII* linearisierter Plasmid-DNA erzeugt wurden. Die grün markierten Klone wurden für eine weiter Kultivierung in einem 100 mL Schüttelkolben mit 5 mL Selektiv-Medium eingesetzt.



**Abbildung 12 - Messung der ÜS aus der 48er Deep-well Platte auf COE-Aktivität. X33/pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H Klone wurden mit *AvrII* linearisierter Plasmid-DNA transformiert**



**Abbildung 13 - Messung der ÜS aus der 48er Deep-well Platte auf COE-Aktivität. X33/pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H Klone wurden mit *AvrII* linearisierter Plasmid-DNA transformiert**

In Tabelle 6 sind jene Klone abgebildet, welche nach dem Vorscreening in der 48er Deep-well Platte für eine weitere Inkubation in einem 100 mL Schüttelkolben mit 5 mL Selektiv-Medium ÜN bei 30°C und 240 rpm ausgewählt wurden. Die Überstände wurden anschließend auf Enzymaktivität hin überprüft und diese gemessen.

**Tabelle 6 - Ermittlung der Enzymaktivität ausgewählter Klone mit dem Konstrukt pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H nach Inkubation ÜN in einem 100 mL Schüttelkolben mit 5 mL Selektiv-Medium**

	Klon	Enzymaktivität in U/mL
SMD1168H/pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H	A6	4
	B6	2,7
	E5	2,8
KM71H/pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H	A1	6,2
	A4	6,2
	E1	8,2
	E5	6,1
X33/pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H	A6	6,1
	B5	2,5
	D4	2,7

Die Enzymaktivität wurde dabei wie im Abschnitt 5.2.1 pGAPZ $\alpha$ A-COE1 beschrieben ermittelt.

### 5.3 Medientest

Die Kultivierung des Klons KM71H/pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H-E1 wurde wie im Methodenteil Medientest beschrieben durchgeführt. Er wurde in den drei Medien FM22, SYN6 und YNB kultiviert. Nach der Kultivierung wurden die ÜS wie beschrieben aufgearbeitet und die Enzymaktivität ermittelt. Dabei wurde im Kultivierungsmedium FM22 eine Aktivität von 6,7 U/mL, bei SYN6 9,7 U/mL und in YNB 8,8 U/mL ermittelt.

**Tabelle 7 – Medientest. Durchgeführt wie in der Methode Medientest beschrieben. Es wurde der Klon KM71H/pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H-E1 in den drei Medien kultiviert. Die Aktivität wurde direkt nach der Aufbereitung der ÜS ermittelt.**

KM71H/pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H-E1	FM22	SYN6	YNB
Enzymaktivität in U/mL	6,7	9,7	8,8

## 5.4 Langzeitstabilitäts-Test

Der Langzeitstabilitäts-Test wurde wie im Materialteil beschrieben durchgeführt. Dabei wurde der Klon KM71H/pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H-E1 in den drei verschiedenen SYN6-Medien kultiviert.

Das folgende Diagramm zeigt den Verlauf der Aktivität in den Aliquote mit den verschiedenen Zusätzen nach der Kultivierung im SYN6-Medium ohne CaCl<sub>2</sub>. Der grau eingefärbte Bereich zeigt den Toleranzbereich, in dem man noch eine Aktivität von 100%  $\pm$ 10% annimmt. Die markierten Punkte sind die Ergebnisse der Messungen, welche wöchentlich durchgeführt wurden. Für jede Messreihe wurde eine Trendlinie gezogen, welche den linearen Verlauf der Aktivität anzeigt. Die Aktivität die direkt nach dem Herstellen der Aliquote ermittelt wurde, bildet den 100%-Wert. Es ist zu erkennen, dass innerhalb der 70 Tage alle Aliquote mit Zusätzen unter die 90% Marke gefallen sind. Der ÜS ohne Zusätze befindet sich noch innerhalb des Toleranzbereiches.

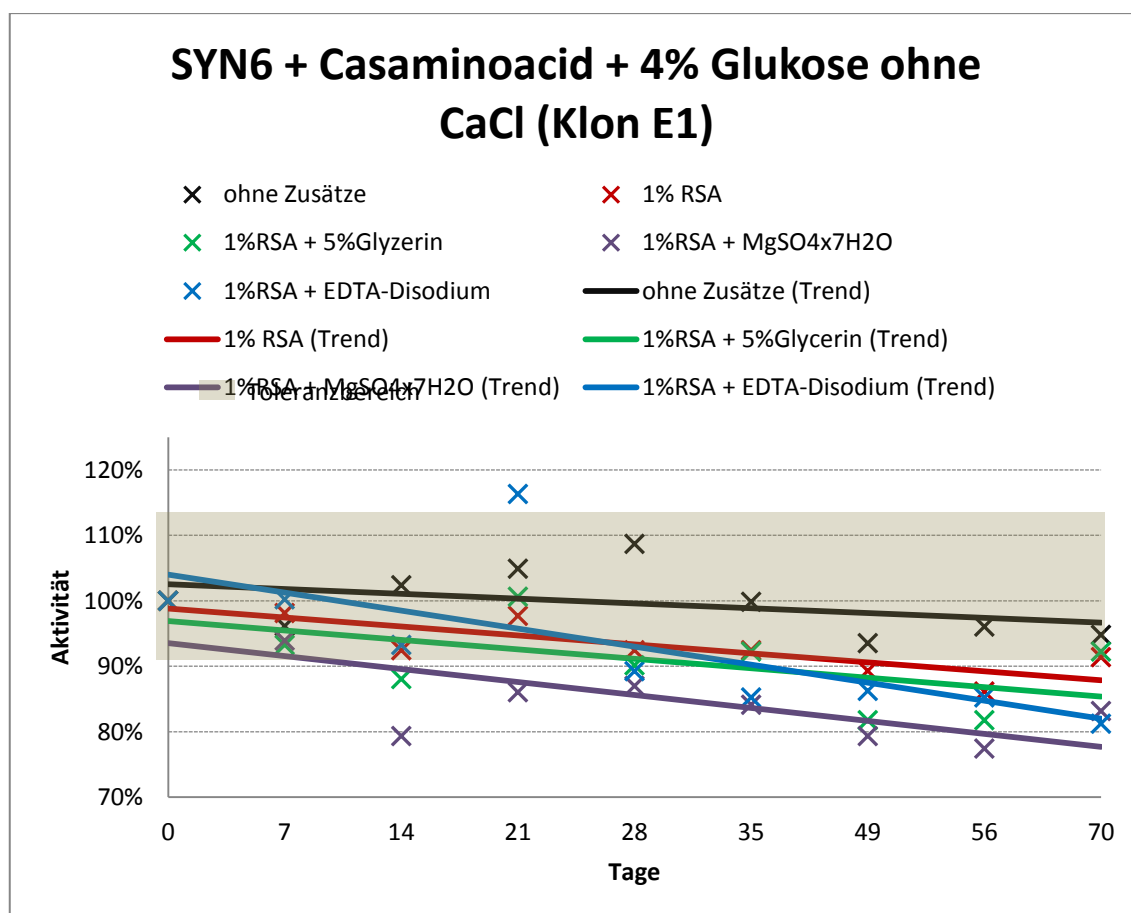
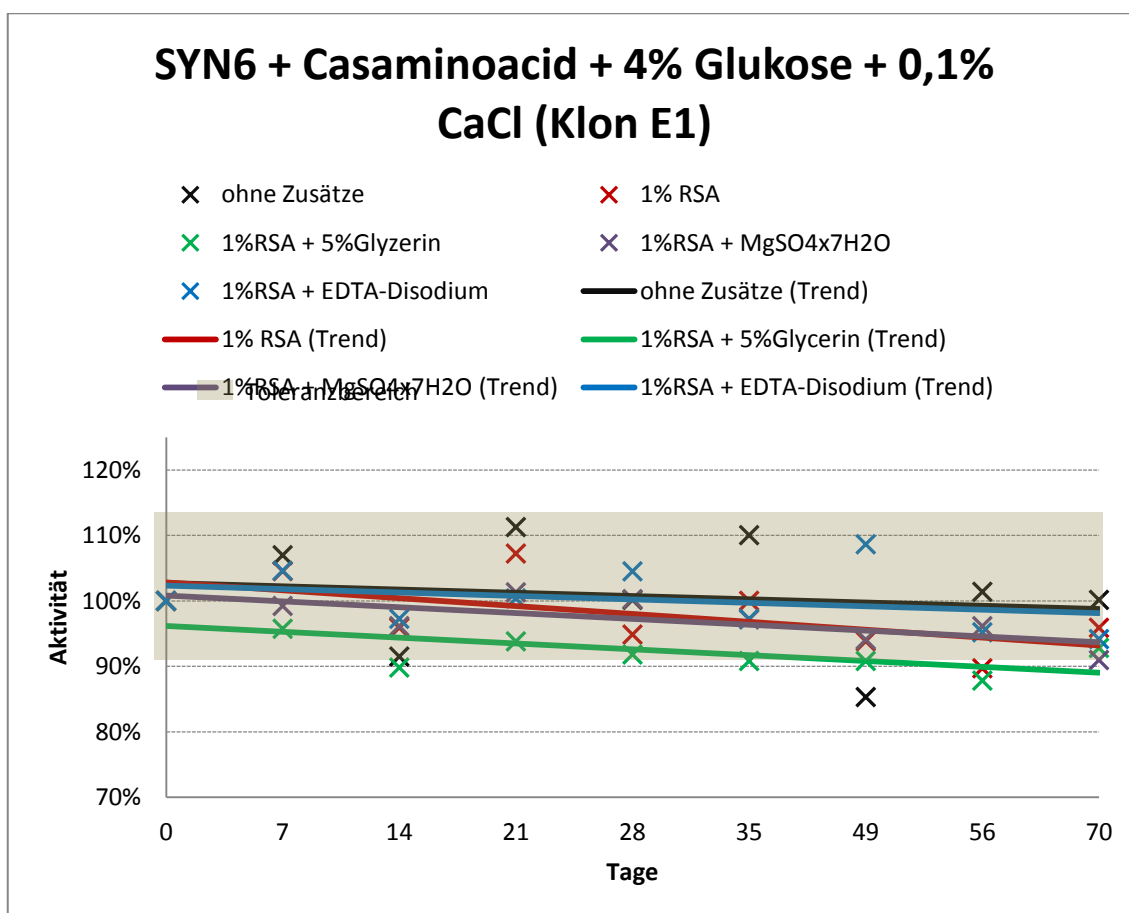


Abbildung 14 – Kultivierung des Klones E1 im SYN6-Medium ohne CaCl<sub>2</sub>. Die Aliquote wurden mit Zusätzen versetzt und die Aktivität gemessen. Der ermittelte Wert wurde = 100% gesetzt.

Das folgende Diagramm zeigt den Verlauf der Aktivität in den Aliquots mit den verschiedenen Zusätzen nach der Kultivierung im SYN6-Medium mit 0,1%  $\text{CaCl}_2$ . Der grau eingefärbte Bereich zeigt den Toleranzbereich, in dem man noch eine Aktivität von  $100\% \pm 10\%$  annimmt. Die markierten Punkte sind die Ergebnisse der Messungen, welche wöchentlich durchgeführt wurden. Für jede Messreihe wurde eine Trendlinie gezogen, welche den linearen Verlauf der Aktivität anzeigt. Die Aktivität die direkt nach dem Herstellen der Aliquote ermittelt wurde, bildet den 100%-Wert. Es ist zu erkennen, dass innerhalb der 70 Tage fast alle Aliquote sich noch im Toleranzbereich befinden. Nur das Aliquot mit den 5% Glycerin ist leicht außerhalb des Toleranzbereiches gefallen.



**Abbildung 15 - Kultivierung des Klones E1 im SYN6-Medium mit 0,1%  $\text{CaCl}_2$ . Die Aliquote wurden mit Zusätzen versetzt und die Aktivität gemessen. Der ermittelte Wert wurde = 100% gesetzt.**

Das folgende Diagramm zeigt den Verlauf der Aktivität in den Aliquots mit den verschiedenen Zusätzen nach der Kultivierung im SYN6-Medium mit 1% CaCl. Der grau eingefärbte Bereich zeigt den Toleranzbereich, in dem man noch eine Aktivität von  $100\% \pm 10\%$  annimmt. Die markierten Punkte sind die Ergebnisse der Messungen, welche wöchentlich durchgeführt wurden. Für jede Messreihe wurde eine Trendlinie gezogen, welche den linearen Verlauf der Aktivität anzeigt. Die Aktivität die direkt nach dem Herstellen der Aliquote ermittelt wurde, bildet den 100%-Wert. Es ist zu erkennen, dass innerhalb der 105 Tage fast alle Aliquote noch im Toleranzbereich liegen. Nur das Aliquot mit  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ist leicht außerhalb des Toleranzbereiches gefallen.

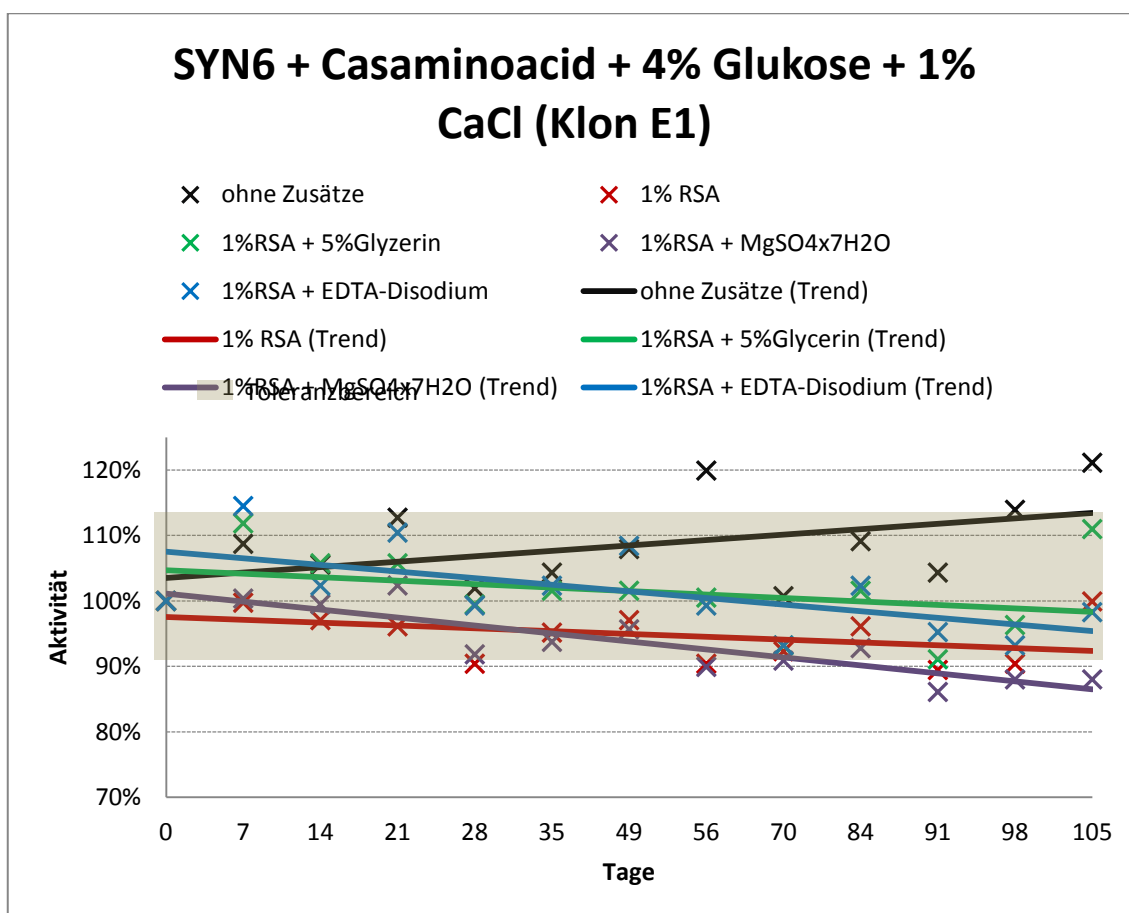


Abbildung 16 - Kultivierung des Klones E1 im SYN6-Medium mit 1% CaCl<sub>2</sub>. Die Aliquote wurden mit den Zusätzen versetzt und die Aktivität gemessen. Der ermittelte Wert wurde = 100% gesetzt.



## 5.5 Reagenztest

Bei dem Reagenztest wurden insgesamt vier verschiedene Chargen getestet. Die Charge Cho-R wurde unter Produktionsbedingungen mit einem Vergleichsenzym hergestellt. CE 729 A wurde in kleinem Maßstab mit dem Vergleichsenzym hergestellt. Die Chargen CE729 B bis D wurden mit verschiedenen KÜ Cholesterinesterase COE1 produziert. Die Kontrollseren wurden frisch und nach Temperaturstress für 3 Tage bei 37°C gemessen. Die in der folgenden Tabelle zu erkennenden Zahlenwerte beschreiben dabei die Konzentration an Cholesterin in mg/dL wie sie zum einen als Sollwert in den Kontrollseren vorliegen, bzw. wie sie durch die Messung berechnet wurden.

**Tabelle 8 - Reagenztest mit den Kontrollseren. Eingesetzt wurden verschiedene Chargen. Cho-R wurde unter Produktionsbedingungen mit dem Kaufenzym hergestellt, CE 729 A wurde in kleinem Maßstab mit dem Kaufenzym hergestellt, CE729 B bis D wurden mit verschiedenen KÜ Cholesterinesterase COE1 produziert.**

Kontrolle	Soll	Bereich			Cho-R	CE 729 A		CE 729 B		CE 729 C		CE 729 D	
						frisch	3d37°C	frisch	3d37°C	frisch	3d37°C	frisch	3d37°C
<b>Humatrol N</b>	162	139	-	184	153,2	153,7	152,4	154,2	155,1	154,7	156,7	155,6	156,1
# 0003	162	139	-	184	152,6	155,3	151,4	155,2	155,3	152,8	155,7	154,0	155,3
<b>Humatrol P</b>	252	217	-	287	250,0	248,1	248,5	251,4	252,5	252,2	252,7	250,2	252,9
# 0003			-		248,3	246,6	247,8	250,8	252,2	250,9	254,8	251,6	252,4
<b>Serodos</b>	190	163	-	217	182,1	180,9	181,4	181,2	181,2	180,6	182,1	180,2	180,4
# 0003			-		181,8	180,4	180,3	181,5	181,6	181,1	179,3	181,1	182,1
<b>Serodos plu</b>	264	227	-	301	261,2	259,8	259,8	259,7	260,0	260,7	260,6	259,4	260,7
# 0003	264	227	-	301	261,1	260,6	260,4	262,0	260,2	261,8	260,4	258,9	260,0
<b>Precinorm</b>	90,9	77,4	-	104,4	89,4	88,6	88,4	87,0	87,5	87,7	86,9	86,8	87,3
# 176982			-		89,3	88,6	88,5	88,1	87,0	87,4	86,4	86,8	87,7
<b>Precipath</b>	201	171	-	231	194,7	194,8	194,8	196,5	195,1	197,7	197,5	193,9	196,5
# 174288			-		194,5	195,2	194,2	195,0	195,9	194,6	196,4	195,2	196,7
<b>OCS-L1</b>	157	135	-	179	153,5	152,8	151,6	153,2	152,1	151,9	153,4	152,3	151,9
# 033			-		154,0	152,8	151,2	153,7	152,0	154,2	154,3	152,7	154,5
<b>OCS-L2</b>	285	245	-	325	280,7	281,0	278,1	280,4	279,7	280,3	281,6	280,0	282,0
# 034			-		279,1	280,9	277,7	280,8	280,5	280,1	282,1	279,2	280,4
<b>PN-L</b>	189	162	-	216	187,6	185,0	185,1	185,4	184,5	183,4	184,2	183,9	183,5
# 172354			-		186,3	187,0	184,4	184,9	183,2	183,2	182,8	184,2	184,0

Zur besseren Veranschaulichung wurde in der folgenden Tabelle die Prozentuale Abweichung der Messergebnisse vom Sollwert der verschiedenen Kontrollseren ermittelt.

**Tabelle 9 – Prozentuale Abweichung der Messergebnisse von den Sollwerten der Kontrollseren. Die Charge Cho-R wurde unter Produktionsbedingungen mit dem Kaufenzym hergestellt, CE 729 A wurde in kleinem Maßstab mit dem Kaufenzym hergestellt, CE729 B bis D wurden mit verschiedenen KÜ Cholesterinesterase COE1 produziert.**

Kontrolle	Cho-R	CE 729 A		CE 729 B		CE 729 C		CE 729 D	
		frisch	3d37°C	frisch	3d37°C	frisch	3d37°C	frisch	3d37°C
<b>Humatrol N</b>	95	95	94	95	96	95	97	96	96
# 0003	94	96	93	96	96	94	96	95	96
<b>Humatrol P</b>	99	98	99	100	100	100	100	99	100
# 0003	99	98	98	100	100	100	101	100	100
<b>Serodos</b>	96	95	95	95	95	95	96	95	95
# 0003	96	95	95	96	96	95	94	95	96
<b>Serodos plu</b>	99	98	98	98	98	99	99	98	99
# 0003	99	99	99	99	99	99	99	98	98
<b>Precinorm</b>	98	97	97	96	96	96	96	95	96
# 176982	98	97	97	97	96	96	95	95	96
<b>Precipath</b>	97	97	97	98	97	98	98	96	98
# 174288	97	97	97	97	97	97	98	97	98
<b>OCS-L1</b>	98	97	97	98	97	97	98	97	97
# 033	98	97	96	98	97	98	98	97	98
<b>OCS-L2</b>	98	99	98	98	98	98	99	98	99
# 034	98	99	97	99	98	98	99	98	98
<b>PN-L</b>	99	98	98	98	98	97	97	97	97
# 172354	99	99	98	98	97	97	97	97	97

## **6 Diskussion**

Schon die Wahl des Restriktionsenzymes, mit welchem das Plasmid vor der Transformation linearisiert wird, bringt sehr unterschiedliche Ergebnisse in der erhaltenen Transformationseffizienz. In Abbildung 1 kann man erkennen, dass beide Restriktionsenzyme *AvrII* bzw. *BspHI* das Plasmid erfolgreich linearisiert haben. Die Transformationseffizienz ist, unabhängig vom eingesetzten Stamm, beim *BspHI* linearisierten Plasmid höher, als bei *AvrII* linearisiertem Plasmid. Bei KM71H/pGAPZ $\alpha$ A-COE1 anstelle von 10 Transformanden pro  $\mu$ g *AvrII* linearisierter Plasmid-DNA 49 Transformanden mit *BspHI* linearisierter Plasmid DNA erhalten. Grund ist die Art und Weise, wie die Fremd-DNA in das Genom der Zelle integriert wird. Die beiden Restriktionsenzyme schneiden an unterschiedlichen Stellen des Promotors im Plasmid. Die Integration erfolgt durch homologe Rekombination. Die Verknüpfung mit den homologen Sequenzen im Genom der Hefe ist durch die unterschiedliche Linearisierung ebenfalls minimal verschieden. Diese minimalen Unterschiede bewirken bereits, dass die Fremd-DNA besser integriert werden kann bzw. die Zellen den Transformationsprozess durch die bessere Integration in größerer Zahl überleben. Warum bei der Transformation mit pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H ausschließlich mit *AvrII* gearbeitet wurde, dazu später mehr.

Gravierende Unterschiede in der Transformationseffizienz bestehen ebenso zwischen den drei Stämmen. SMD1168H hat mit 152 Kolonien die meisten Transformanden pro  $\mu$ g Plasmid-DNA hervorgebracht, während KM71H mit nur 10 Transformanden pro  $\mu$ g DNA bedeutend weniger erzeugt hat. X33 bildet mit 101 Transformanden pro  $\mu$ g DNA das Mittelfeld. Das liegt daran, dass jeder Stamm die Transformation und die DNA Integration anders vertragen. Auch wenn X33 der Wildtyp-Stamm ist und so der robustere von allen ist, ist dies kein Kriterium für eine gesteigerte Transformationseffizienz. Es müssen demnach stets verschiedene Stämme untersucht werden, da anhand der Eigenschaften keine direkten Rückschlüsse auf die Transformationseffizienz gezogen werden können.

Auch das eingesetzte Konstrukt macht einen Unterschied. Durch das His-Tag im Konstrukt konnte die Transformationseffizienz teilweise um ein vielfaches gesteigert werden. Wo es ohne His-Tag bei SMD1168H 152 Transformanden gab, da sind es mit

His-Tag 351. Bei X33 konnte die Transformationseffizienz von 101 auf 270 gesteigert werden. Mit KM71H gibt es keinen Unterschied zwischen den beiden eingesetzten Konstrukten. Dass es mit His-Tag mehr Transformanten gibt, könnte daran liegen, dass dieses Konstrukt etwas kleiner ist (4307 bp), als das Konstrukt ohne His-Tag (4362). Das linearisierte Fragment könnte so leichter während des Transformationsprozesses in die Zelle gelangen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass sich ein kleineres Fragment einfach leichter in das Genom integrieren lässt, als ein größeres Fragment. Wie man jedoch wieder sehen kann, ist das von Stamm zu Stamm unterschiedlich. Andere Konstrukte könnten sich demnach in den unterschiedlichen Stämmen wieder völlig anders verhalten, weshalb bei jedem neuen Konstrukt wiederum alle Stämme verwendet werden sollten, um zu ermitteln, welcher der optimalste Stamm ist.

Das Screening der 48er Deep-well Platten ergab, dass Qualität vor Quantität geht. Die Klone, welche mit *Bsp*HI linearisiertem Plasmid transformiert wurden, zeigten nur geringe bis gar keine Aktivität, während die Klone, die mit *Avr*II linearisiertem Plasmid transformiert wurden, deutlich höhere Aktivitäten aufwiesen. Aus diesem Grund wurde bei der Transformation mit pGAPZαA-COE1-6H ausschließlich *Avr*II genutzt, da hier die besseren Ergebnisse zu erwarten waren. Von diesem Vorscreening wurden einige Klone, die die beste Aktivität gezeigt haben, ausgewählt und in einem Schüttelkolben inkubiert, um einen gewissen Scale-up Prozess zu simulieren und das Verhalten der Klone unter anderen Bedingungen zu ermitteln. Die Aktivität der Klone konnte auf diese Weise gesteigert werden, wobei die Verhältnisse aus dem Vorscreening bestehen blieben. Der Klon E1 aus KM71H/pGAPZαA-COE1-6H zeigte im Vorscreening die beste Aktivität. Auch nach dem Scale-up Prozess zeigte dieser Klon mit 8,2 U/mL immer noch die beste Aktivität. Es zeigt sich, dass die Stamm-Konstrukt Kombination mit der geringsten Transformationseffizienz die besten Klone hervorbringt.

Nachdem der Klon E1 als der beste Klon erzeugt wurde, musste das Kultivierungsmedium optimiert werden. Er wurde in FM22, SYN6 und YNB kultiviert. Dabei stellte sich SYN6 mit 9,7 U/mL als das Medium mit der höchsten Ausbeute heraus. FM22 ergab nur eine Aktivität von 6,7 U/mL und wurde deshalb nicht weiter berücksichtigt. Das YNB brachte immerhin 8,8 U/mL, weshalb es als Alternative zu SYN6 betrachtet werden könnte, sollte dieses beim Langzeitstabilitätstest nicht bestehen.

Für den Langzeitstabilitätstest wurde das SYN6-Medium mit drei unterschiedlichen  $\text{CaCl}_2$  Konzentrationen versetzt. Der Grund dafür ist, dass  $\text{CaCl}_2$  einen Einfluss auf die Stabilität der Enzyme hat. Dabei wird es beim synthetisieren der rekombinanten Cholesterinesterase in der Hefezelle im Enzym eingebaut und erhöht so die Stabilität des Enzyms. Allerdings hat das  $\text{CaCl}_2$  auch negative Auswirkungen auf die Stabilität des Enzyms, wenn es sich nach der Kultivierung noch im Kulturüberstand befindet. Betrachtet man in den Abbildungen 1-3 die Aliquote ohne Zusätze, kann man erkennen, dass das Medium mit 1%  $\text{CaCl}_2$  über die Zeit einen leichten Anstieg der Trendlinie aufweist, während es bei den Medien mit geringerer Konzentration eine leicht absteigende Trendlinie ist. Die restlichen Zusätze wie Rinderserumalbumin (RSA), Glycerin, Magnesiumsulfat oder EDTA sollten der Erhöhung der Enzymstabilität dienen. Das zugegebene EDTA soll überschüssige Ionen, wie das zweiwertige  $\text{Ca}^{2+}$  Kation binden, welche das Enzym eventuell inhibieren oder inaktivieren könnten. Nach 70 Tagen waren die Proben vom Ansatz mit 1%  $\text{CaCl}_2$  am stabilsten und so wurde nur dieser Ansatz weiter verfolgt. Ohne Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  zum Überstand sank die Enzymaktivität nach 70 Tagen unter 90% der Ausgangsaktivität Grenze. Mit Zugabe von 0,1%  $\text{CaCl}_2$  fiel nur die Probe mit RSA und Glycerin unter die 90% Grenze. Alle anderen Aliquote befinden sich noch im Toleranzbereich, besitzen allerdings einen gewissen Abwärtstrend. Dabei waren die Probe ohne Zusätze bzw. mit Zusatz von RSA und EDTA am besten. Der Ansatz mit 1%  $\text{CaCl}_2$  ergab nach 105 Tagen, dass nur die Probe mit RSA und Magnesiumsulfat den Toleranzbereich unterschritten hat. Die anderen Aliquote mit den Zusätzen sind innerhalb des Toleranzbereiches geblieben. Die Probe ohne Zusätze liegt sogar über dem Toleranzbereich. Die Aktivität ist hier sogar angestiegen. Die Kultivierung des Klons E1 im Medium SYN6 mit 1%  $\text{CaCl}_2$  ist somit am besten. Die Lagerung der KÜ kann anschließend ohne Zusätze bei 4°C stattfinden. Betrachtet man die Diagramme so ist auffällig, dass die einzelnen wöchentlichen Messwerte teilweise stark schwanken. Das liegt vor Allem an der Empfindlichkeit der Messmethode. Besonders da das Messreagenz vor der Messung auf 37°C erwärmt wird, das eingesetzte Photometer jedoch nicht beheizt werden kann, kommt es während der Messung zur Abkühlung des Reagenzes und folglich zur Veränderung der Enzymkinetik. So konnte beobachtet werden, dass Schwankungen der Raumtemperatur die Messungen beeinflussen können, da die Abkühlungsrate an warmen Tagen geringer

war, als an kühleren. Dazu kommen Pipettierfehler. Sowohl beim Verdünnen der ÜS, als auch bei Zugabe der Proben in die UV-Küvette können schon geringe Abweichungen völlig unterschiedliche Ergebnisse bringen, vor Allem dann, wenn Tropfen der Enzymlösung an der Pipette haften bleiben und so ungewollt mehr Enzymlösung in der Küvette platziert wird als beabsichtigt. Aus diesem Grund wurden Trendlinien für die einzelnen Messreihen ermittelt, um so den Verlauf besser erkennen zu können.

Für den Reagenztest wurden drei Herstellchargen von rekombinanter Cholesterinesterase parallel kultiviert, um sie anschließend im Reagenz einzusetzen. Der HumaStar 600 mischte dabei voll automatisch das Reagenz mit den Kontrollseren, ermittelte die Messkurve und berechnete die Cholesterinkonzentration in mg/dL der Probe. Jedes Kontrollserum setzt sich dabei aus verschiedenen Cholesterinen zusammen, Isomere wie sie auch im menschlichen Körper vorkommen. Damit soll das Substratspektrum der eingesetzten Cholesterinesterase überprüft werden. Die anschließenden 3 Tage Lagerung bei 37°C sollen eine simulierte Transportphase sein, da das Reagenz nicht sofort verkauft und während des Transportes evtl. nicht immer unter optimalen Bedingungen gelagert wird. Deshalb wird nach diesen drei Tagen die gleiche Messung noch einmal durchgeführt. Zur besseren Veranschaulichung der Messergebnisse wird die prozentuale Abweichung der Messungen vom Sollwert der Kontrollseren betrachtet. Hier kann man feststellen, dass auch nach den drei Tagen keine Messung um mehr als 6% abweicht, was im Toleranzbereich liegt.

## **7 Ausblick**

Nach den Tests müsste der Scale-up Prozess durchgeführt werden. Das bedeutet die schrittweise Erhöhung des Kultivierungsvolumens zunächst im Schüttelkolben, weiter in einen kleinen Fermenter, zum Beispiel 2L, bis hin zu einem großen Fermenter, wie etwa einem 100 L Fermenter. Gleichzeitig muss der Downstreamprozess entwickelt werden, mit welchem man die höher werdenden Kultivierungsvolumina verarbeiten kann.

## **8 Zusammenfassung**

Als Resultat ergibt sich, dass Qualität vor Quantität geht. Beim Vergleich der beiden Restriktionsenzyme für die Elektroporation zeichnete sich *BspHI* zwar durch eine erhöhte Transformationseffizienz aus, die erzeugten Klone wiesen jedoch eine wesentlich schlechtere Cholesterinesterase Ausbeute auf, als jene, die mit *AvrII* linearisiertem pGAPZ $\alpha$ A-COE1 Plasmid transformiert wurden. Aus diesem Grund wurde bei der Transformation mit dem His-getaggtten pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H Plasmid ausschließlich *AvrII* zur Linearisierung der Plasmid-DNA vor der Elektroporation eingesetzt.

Unterschiede sind auch zwischen den drei Stämmen SMD1168H, KM71H und X33 selbst zu erkennen. Dabei zeigt vor allem der KM71H Stamm eine signifikant geringere Transformationseffizienz, KM71H/pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H etwa erzeugt mehr als 20mal weniger Transformanden pro  $\mu$ g Plasmid-DNA, als die beiden anderen Stämme. Dennoch ist dies der Stamm der Wahl, denn hier entstanden die besten Klone mit den höchsten Enzymaktivitäten.

Die Wahl des Konstruktes stellte sich als letzter entscheidender Faktor heraus. Hier konnte durch den His-Tag die Transformationseffizienz gesteigert- und gleichzeitig die Enzymaktivität erhöht werden. Aus diesen drei Faktoren ergab sich schlussendlich der beste Klon *P.pastoris* KM71H/pGAPZ $\alpha$ A-COE1-6H mit einer Aktivität von 8,2 U/mL. Die Plasmid-DNA wurde in diesem Fall vor der Elektroporation mit *AvrII* linearisiert.

Als nächster Schritt wurde das Kultivierungsmedium optimiert, um eine maximale Cholesterinesterase-Enzymausbeute zu erreichen. Von den drei Kultivierungsmedien YNB, SYN6 und FM22 stellte sich SYN6 als das beste heraus, mit einer Enzymaktivität von 9,7 U/mL

Um die Langzeitstabilität zu testen, wurden drei Ansätze SYN6 mit verschiedenen CaCl<sub>2</sub>-Konzentrationen zum Kultivieren des Klons E1 eingesetzt, um den Zusammenhang zwischen dem CaCl<sub>2</sub> und der Enzymstabilität zu ermitteln. Zusätzlich wurden die Überstände aliquotiert und mit verschiedenen Zusätzen versehen, um die so präparierten ÜS über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Daraus ergab sich, dass 1% CaCl<sub>2</sub> im SYN6 Kultivierungsmedium die Stabilität gegenüber geringeren CaCl<sub>2</sub>-



Konzentrationen erhöht. Zusätzlich war die Probe ohne Zusätze wie RSA, Glycerin oder EDTA am stabilsten.

Schlussendlich wurde die Funktionalität des Langzeit gelagerten Enzymes im Cholesterol-Reagenz überprüft, in das es eingesetzt werden soll. Dazu wurde der HumaStar600 und verschiedene Kontrollseren, wie etwa Humatrol N, Serodo s oder Precinorm-L, eingesetzt, um die Funktionsfähigkeit und das Substratspektrum der COE zu überprüfen. Zusätzlich wurde das Reagenz nach einer Lagerung von 3 Tagen bei 37°C erneut gemessen. Als Resultat ergab sich, dass alle Messungen um maximal 6% vom Sollwert abwichen, das Enzym also im Reagenz funktioniert und unter Temperaturstress stabil bleibt.

**Literaturverzeichnis****Dissertationen**

- Ahmad et. al. (2014) Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production.
- Cereghino (2005) Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*
- Cereghino & Cregg (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*.
- J. Zhang et al. (2005) Association of serum cholesterol and history of school suspension among school-age children and adolescents in the United States
- Lopez et. al. (2008) Metabolic Profile of Breast Cancer in a Population of Women in Southern Spain
- Ray & Husain (2001) Role of lipids, lipoproteins and vitamins in women with breast cancer
- Siegenthaler (2005) *Siegenthalers Differentialdiagnose: Innere Krankheiten-vom Symptom zur Diagnose*. 19. Auflage, Georg Thieme Verlag, ISBN 978-3-13-344819-2, S. 1060.
- Suarez (1999) Relations of Trait Depression and Anxiety to Low Lipid and Lipoprotein Concentrations in Healthy Young Adult Women

**Quellen aus dem Internet**

- URL-1 (Zugriff 15/06/2015) <http://www.u-helmich.de/bio/gen/reihe4/seite41.html>
- URL-2 (Zugriff 15/06/2015) <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AOX1>

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 17.06.2015

Dennis Kunze